

Luís Diogo Pereira da Costa

**Avaliação da Taxa de Fertilidade em Éguas da Raça
Puro Sangue Lusitano – Efeito da Idade da Égua e do
Tipo de Cobrição (Cobrição Natural vs Inseminação
Artificial)**

Orientador: Professor Doutor Carlos Varela Bettencourt

Co-Orientador: Dr. José Carlos Duarte

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2014

Luís Diogo Pereira da Costa

**Avaliação da Taxa de Fertilidade Em Éguas da Raça
Puro Sangue Lusitano – Efeito da Idade da Égua e do
Tipo de Cobrição (Cobrição Natural vs Inseminação
Artificial)**

Dissertação apresentada para a obtenção do
Grau de Mestre em Medicina Veterinária no
curso do Mestrado Integrado em Medicina
Veterinária conferido pela Universidade
Lusófona de Humanidades e Tecnologias

**Orientador: Professor Doutor Carlos Varela
Bettencourt**

Co-orientador: Dr. José Carlos Duarte

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2014

Epígrafe

Há cientistas de vários géneros, mas a inspiração flui mais frutiferamente daqueles que são capazes, através de algum dom desconhecido de homens menores, de adivinhar a riqueza de países desconhecidos e sentir os marcos vitais.

Assim eles evitam os lugares áridos e os pântanos de detalhe sem importância que engolem tantos outros. Para eles, a descoberta é uma arte ao invés de uma ciência, uma questão de instinto ao invés de maquinaria intelectual.

A. S. Parkes; 1949

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Dr. José Carlos Duarte por ter aceite o meu estágio, e pela forma como me acolheu na Luso-Pecus.

À Dr.^a. Cristina Cosinha pelos conhecimentos que me transmitiu e pela forma como me tratou ao longo de todo o estágio.

À Dr.^a. Rita Rocha Pires pelos ensinamentos que me deu de prática clínica e pela boa disposição com que me transmitiu os seus conhecimentos.

Ao Professor Doutor Carlos Bettencourt por ter aceite a orientação desta dissertação e à Dr.^a. Maria Gaivão pela paciência e extrema disponibilidade ao longo de todo este tempo e pela ajuda na realização desta dissertação.

Ao sr. Armando, pela maneira bem disposta com que me recebeu na Luso Pecus e pelas longas conversas que ajudavam a passar o tempo

Aos amigos que fiz ao longo dos anos, especialmente Carlota Vidigueira, Diogo Carvalheira e Miguel Oliveira Pinto que me ajudaram a superar os obstáculos que se iam apresentando pelo caminho, e em particular a Ana Margarida Vale, João Almeida, Miguel Vicente, Ricardo Pais e Rui Antunes, por se terem tornado num grupo de amigos inseparáveis que me proporcionou momentos de diversão quando precisava de espairecer, e me incentivou a continuar sempre que era necessário, e à Margarida Jorge, que ao procurar companhia e alento para trabalhar na sua dissertação, me ajudou a encontrá-los para a minha.

Aos meus pais Luís Costa e Maria Paula, pela paciência e pelos ensinamentos transmitidos ao longo de todos estes anos, e por nunca terem perdido a fé em mim.

Ao meu irmão João Paulo por, sem me pressionar, demonstrar sempre interesse pelo progresso da dissertação ajudando-me a seguir em frente.

Ao meu sobrinho Gonçalo Cruz, por me fazer sempre esquecer por breves momentos que tinha que trabalhar, permitindo-me limpar a cabeça e ganhar força para continuar.

À minha namorada, Mariana Turras, por insistir comigo quando era preciso, e pelo ânimo que me deu para conseguir concluir esta dissertação, estando sempre presente quando era necessário.

Abreviaturas

°C – Graus Celsius

% - por cento

cm – centímetros

CE - Concentração de espermatozóides

eCG – Gonadotrofina coriônica equina

EV - Endovenoso

FA – Frequência Absoluta

FR – Frequência Relativa

FSH – Hormona estimuladora dos folículos

GnRH – Hormona libertadora de gonadotrofinas

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

i.e. – isto é

IA – Inseminação Artificial

LH – Hormona luteinizante

ml – mililitros

mm – milímetros

p.ex. – por exemplo

PGF_{2α} – Prostaglandina F_{2α}

PMS – Espermatozóides com motilidade progressiva

PSI – Puro Sangue Inglês

PSL – Puro Sangue Lusitano

SNC – Sistema Nervoso Central

UI – Unidades Internacionais

VI – Volume de Inseminação

vs. - Versus

Resumo

Ao longo dos meses de estágio acompanhei diversos procedimentos médicos veterinários, sendo que a maior parte deles diziam respeito à área da reprodução equina.

A Raça Puro Sangue Lusitano (PSL) é a mais importante raça portuguesa autóctone de equinos. Contudo, não existem muitos estudos no que respeita à sua eficiência reprodutiva. Este trabalho pretende fazer um estudo sobre o efeito da idade da égua e do tipo de cobertura (natural e inseminação artificial - IA) na taxa de fertilidade de éguas PSL, através do cálculo das diferentes taxas de gestação. Neste estudo, verificou-se que a percentagem de éguas gestantes no final da época reprodutiva foi de 90%, encontrando-se dentro dos valores esperados (71% - 96%).

Os dados foram recolhidos durante a época reprodutiva de 2011/2012 e permitiram-me elaborar um estudo retrospectivo para melhor perceber a prática do manejo reprodutivo equino e a influência de alguns parâmetros na taxa de fertilidade das éguas.

Relativamente aos diferentes tipos de sêmen, verificou-se que a taxa de fertilidade em éguas cobertas por cobertura natural (n=14) foi de 78,6% e por IA (n=36) foi de 94,4%, resultado que se situa dentro dos valores esperados. No que respeita à IA, a taxa de fertilidade com sêmen fresco (n=16) foi de 93,8%, com sêmen refrigerado (n=19) foi de 94,7% e com sêmen congelado (n=1) foi de 100%. Os valores para sêmen fresco e refrigerado encontram-se dentro do esperado, sendo que para sêmen congelado este é muito superior aos valores reportados na bibliografia, visto ser o tipo de sêmen com menores taxas de fertilidade. Este facto deve-se, provavelmente, à dimensão da amostra, e ao facto de o sêmen congelado ser de elevada qualidade.

Neste estudo verificamos também que não há relação estatística entre a idade das éguas e a taxa de gestação, contrariamente ao que é referido na bibliografia, o que se deverá provavelmente ao tamanho da amostra (n=50).

Palavras-Chave: Reprodução Equina; Taxa de fertilidade; Eficiência Reprodutiva; Inseminação artificial

Abstract

During my internship I have observed and participated in clinical procedures, most of them regarding equine reproduction.

The Lusitanian Pure Blood (PSL) is the most important Portuguese autochthonous breed. However there aren't many studies regarding its reproductive efficiency. This paper intends to study the effect of the mare's age and of the type of breeding (natural and artificial insemination - IA) in the fertility rate of PSL mares, using the calculation of the pregnancy rates. In this study it was verified that the percentage of pregnant mares by the end of the reproductive season was 90%, being within the expected values (71 - 96%). Concerning the type of mating it was verified that the pregnancy rate in mares using natural mating (n=14) was 78,6%, and using IA (n=36) was 94,4%, results within the expected values.

The data was collected during the reproductive season of 2011/2012 and allowed me to elaborate a retrospective study in order to better understand equine reproduction practice and the influence of some parameters in the mares pregnancy rate.

Regarding the IA, the pregnancy rate using fresh semen (n=16) was 93,8%, cooled semen (n=19) was 94,7% and frozen semen (n=1) was 100%. The values regarding fresh and cooled semen are within the expected, however for frozen semen it is too high when compared with values reported on the bibliography, since it is the type of semen with lower pregnancy rates. This is probably due to the dimension of the sample, and that the frozen semen was of very high quality.

In this study it was also verified that there is no statistical relationship between the mare's age and the pregnancy rate, contrasting with what is said in the bibliography, probably due to the dimension of the sample (n=50).

Keywords: Equine reproduction; Fertility rate; Reproductive efficiency; Artificial Insemination

Índice

Epígrafe.....	3
Agradecimentos	4
Abreviaturas.....	5
Resumo	6
Abstract	7
Índice de figuras.....	11
Índice de tabelas.....	12
Índice de gráficos.....	13
1. Introdução.....	14
1.1 Anatomia e fisiologia reprodutiva	15
1.1.1 Anatomia e fisiologia reprodutiva do garanhão	15
1.1.2 Anatomia e fisiologia reprodutiva da égua.....	16
1.2 Sazonalidade reprodutiva.....	17
1.3 O ciclo éstrico.....	18
1.4 Gestação	20
1.5 Avaliação do aparelho reprodutor da égua	21
1.5.1 História	21
1.5.2 Registos	22
1.5.3 Examinação da genitália externa	22
1.5.4 Exame visual da vagina e cérvix	23

1.5.5	Exame rectal	24
1.5.5.1	Palpação dos ovários	25
1.5.5.2	Palpação do útero	27
1.5.5.3	Cérvix	28
1.5.5.4	Diagnóstico de gestação	30
1.6	Eficiência reprodutiva	33
1.7	Causas de sub-fertilidade	35
1.8	Cobrição natural vs. Inseminação artificial (IA)	43
	Cobrição natural	44
	Inseminação artificial	45
1.8.1	Sémen	47
	Avaliação e processamento do sémen	47
	Sémen fresco, refrigerado e congelado.....	48
	Taxas de fertilidade	49
	Sémen fresco.....	49
	Sémen refrigerado.....	50
	Sémen congelado	50
1.8.2	Critérios para definir o momento da IA.....	51
1.8.3	Factores que afectam a eficiência da IA	51
	Garanhão.....	51
	Égua.....	51

Objectivos	52
2. Materiais e métodos.....	52
2.1 Casuística das actividades desenvolvidas	52
2.2 Metodologia das inseminações	56
2.2.1 Recolha de sémen	57
2.3 Resultados.....	59
2.3.1 Éguas	60
2.3.2 Garanhões	62
2.3.3 Taxas de fertilidade	64
2.3.3.1 Influência do tipo de sémen na taxa de fertilidade	64
2.3.3.2 Influência da idade na taxa de fertilidade	65
3. Discussão e conclusões	66
Bibliografia	70
Apêndices.....	79

Índice de Figuras

Figura 1 - Centro de recolha e congelação de sémen, número PT3E01CS, da luso-pecus..... 14

Figura 2 - Níveis hormonais e correspondente actividade ovárica ao longo do ciclo éstrico ... 17

Figura 3 - Sazonalidade das éguas ao longo do ano..... 18

Figura 4— Diferentes instrumentos para recolha e armazenamento de sémen na Luso-Pecus .. 54

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1 - Alterações cervicais e vaginais durante as diferentes fases do ciclo éstrico</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 2 - Alterações tácteis e visuais da genitália tubular utilizando vários instrumentos e observação directa durante o ciclo éstrico da égua</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 3 - Diâmetro da vesícula embrionária numa fase inicial da gestação</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 4 - Achados ultra-sonográficos consoante os dias pós-ovulação</i>	<i>31</i>
<i>Tabela 5- Diferentes métodos de diagnóstico de gestação</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 6- Causas de perda precoce de gestação</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 7 - Recomendações para utilização dos diferentes tipos de sémen para IA</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 8 - Frequência absoluta e relativa das intervenções realizadas durante o estágio</i>	<i>52</i>
<i>Tabela 9 - Frequência absoluta e frequência relativa dos diferentes tipos de intervenções no controlo reprodutivo</i>	<i>55</i>

Índice de Gráficos

<i>Gráfico 1 - Frequência absoluta do controlo reprodutivo de éguas e garanhões</i>	<i>54</i>
<i>Gráfico 2 - Frequência relativa do controlo reprodutivo de éguas e garanhões</i>	<i>54</i>
<i>Gráfico 3 - Idade das diferentes éguas utilizadas.....</i>	<i>55</i>
<i>Gráfico 4 – Percentagem de éguas cobertas naturalmente e inseminadas artificialmente</i>	<i>59</i>
<i>Gráfico 5 - Diferentes tipos de sémen utilizados nas éguas.....</i>	<i>60</i>
<i>Gráfico 6 - Quantidade de éguas gestantes e não gestantes.....</i>	<i>60</i>
<i>Gráfico 7 - Quantidade de ciclos necessários por égua</i>	<i>61</i>
<i>Gráfico 8 - Quantidade de tentativas por égua.....</i>	<i>62</i>
<i>Gráfico 9 - Quantidade de éguas inseminadas/cobertas por garanhão</i>	<i>62</i>
<i>Gráfico 10 - Éguas gestantes e não gestantes por garanhão por cobrição natural</i>	<i>63</i>
<i>Gráfico 11 - Éguas gestantes e não gestantes por garanhão através de IA</i>	<i>63</i>
<i>Gráfico 12 - Éguas gestantes e não gestantes por IA e por cobrição natural</i>	<i>64</i>
<i>Gráfico 13 - Percentagem de éguas gestantes e não gestantes através de IA</i>	<i>67</i>
<i>Gráfico 14 - Percentagem de éguas gestantes e não gestantes através de Inseminação Artificial e de Cobrição Natural.....</i>	<i>68</i>

1. INTRODUÇÃO

Este estudo foi realizado ao longo de quatro meses de estágio, entre Março e Junho de 2012, sendo este realizado principalmente no âmbito da assistência médico veterinária em reprodução de equinos. Desde Março de 2012 até ao mês de Junho do mesmo ano fui integrado como estagiário na empresa de prestação de serviços veterinários Luso-Pecus, sediada em Porto Alto.

Durante o tempo de estágio acompanhei o trabalho da veterinária Dra. Cristina Cosinha. Uma parte da assistência foi prestada em regime ambulatorio, sendo a restante parte prestada no centro de recolha e congelação de sémen número PT3E01CS (figura 1), o primeiro centro Português autorizado e presente na lista da união europeia dos centros de recolha e congelação de sémen.

A área geográfica abrangida pelo estágio foi bastante ampla, tendo contudo a maior parte do trabalho sido realizada na região do Ribatejo. Tive ainda oportunidade de participar em assistências na Costa da Caparica, Azeitão, Vendas Novas e Évora.



Figura 1 - Centro de recolha e congelação de sémen, número PT3E01CS, da luso-pecus

Para prestar uma boa assistência no âmbito do manejo reprodutivo, os Médicos Veterinários precisam de conhecer o ciclo éstrico, a anatomia e a fisiologia reprodutiva das éguas e o seu historial clínico, assim como a fisiologia básica do sémen dos garanhões, bem como saber interpretar os exames de ecografia e manusear correctamente o sémen (Blanchard *et al.*, 2003; Samper, 2009).

Os exames reprodutivos são uma parte importante da prática clínica, sendo o exame mais utilizado a palpação rectal. Existem no entanto já uma variedade de exames

clínicos, assim como de equipamento de ultra-sonografia, que permitem uma maior precisão de diagnóstico do que anteriormente (Rose & Hodgson, 1993). Isto, associado a tecnologias como a inseminação artificial (IA) com sémen refrigerado ou congelado tornou-se bastante comum na prática veterinária (Samper, 2001; Blanchard *et al.*, 2003; Cuervo-Arango *et al.*, 2009). Devido a todos estes factores torna-se necessário fazer uma avaliação bastante precisa da égua e do garanhão, assim como das condições e eficiência reprodutiva de ambos, para conseguir obter bons resultados e maximizar os resultados da época reprodutiva, e avaliar a eventual utilização de técnicas de reprodução assistida para otimizar os resultados (Coutinho da Silva, 2008).

A reprodução equina apresenta algumas particularidades relativamente a outras espécies, nomeadamente: os animais iniciam a sua vida reprodutiva cerca dos 3 anos de idade, a gestação demorar em média onze meses e só haver um poldro por parto, e o ser comum a ocorrência de reabsorções embrionárias e abortos (Sullivan *et al.*, 1975; Platt, 1978; Rose & Hodgson, 1993; McKinnon *et al.*, 2011).

1.1 Anatomia e Fisiologia Reprodutiva

Conhecer a anatomia e fisiologia equina é de extrema importância para se conseguir efectuar eficazmente o manejo reprodutivo da espécie, tendo em conta as suas particularidades e funcionamento. Tal conhecimento fornece uma série de benefícios, uma vez que ajuda a alcançar o sucesso reprodutivo, minimizando as perdas de produtividade reprodutiva e económicas para o criador (Samper, 2009).

1.1.1 Anatomia e Fisiologia reprodutiva do garanhão

As gónadas masculinas, ou testículos, são o principal órgão reprodutor no macho. No garanhão o aparelho reprodutor engloba testículos, epidídimo, canal deferente, uretra, pénis e prepúcio, bem como as glândulas sexuais acessórias, nomeadamente as vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais (Pineda & Dooley, 2003; Samper, 2009).

Relativamente à fisiologia reprodutiva, existem mecanismos de feedback hormonal e de controlo endócrino, sendo que a produção de espermatozóides vai acontecer devido à produção de Hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo. Esta hormona vai actuar na hipófise causando a libertação de Hormona Luteinizante (LH) e de Hormona estimuladora dos folículos (FSH). A LH actuará nas

células de Leydig, estimulando a produção de testosterona e a FSH nas células de Sertoli, que libertam proteínas importantes na produção e diferenciação de espermatozóides. A testosterona é responsável pelo comportamento do garanhão, libido e manutenção dos caracteres sexuais secundários (Pineda & Dooley, 2003; Carreau & Hess, 2010).

1.1.2 Anatomia e Fisiologia reprodutiva da égua

Como já foi referido, o clínico tem de conhecer a anatomia e fisiologia das éguas se quiser implementar um programa de reprodução bem sucedido.

Os principais órgãos reprodutores femininos incluem os ovários (onde se podem encontrar folículos e corpos lúteos), genitália tubular interna (oviductos, útero, cérvix e vagina) e externa (vulva e lábia), e úbere. Estes órgãos são, em parte, funcionalmente dependentes de interacções entre hormonas e receptores hormonais, especialmente das hormonas neuroendócrinas, produzidas e secretadas pelo hipotálamo e hipófise (Blanchard *et al.*, 2003; Samper, 2009).

Para além dos mecanismos de feedback hormonal entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e os órgãos reprodutivos, certos órgãos, como os ovários e o útero, podem comunicar entre si através de outros mecanismos de feedback e, assim, o sistema endócrino serve como um mecanismo de comunicação com, e entre, os diversos órgãos do sistema reprodutivo, para regular e coordenar as diversas acções que acontecem durante a vida reprodutiva de uma égua (Pineda & Dooley, 2003; Samper, 2009).

A hipófise, hipotálamo e hipófise formam o principal eixo de controlo neuroendócrino, que está envolvido na puberdade, ciclicidade reprodutiva e gestação (Pineda & Dooley, 2003).

O desenvolvimento folicular durante o ciclo éstrico depende da concentração de FSH em circulação, enquanto que a selecção de um folículo e subsequente dominância estão associadas com uma diminuição da FSH e um aumento da LH (Pineda & Dooley, 2003; Ginther *et al.*, 2008b). O contínuo crescimento e manutenção do folículo dominante após a sua selecção são, assim, dependentes das concentrações de LH. Paralelamente ao aumento das dimensões do folículo, também o estradiol continua a aumentar, chegando à sua concentração máxima cerca de 1 a 2 dias antes da ovulação, na altura em que as dimensões foliculares estão próximas do seu máximo (Donadeu & Pedersen, 2008; Ginther *et al.*, 2008b; Samper, 2009).

Os folículos maduros são clinicamente mais relevantes pois são a principal fonte de esteróides sexuais (estrogénios, progesterona e androgénios) que influenciam o crescimento e atrofia folicular, alterações funcionais e estruturais uterinas e cervicais, comportamento éstrico, desenvolvimento dos oócitos e ovulação (Pineda & Dooley, 2003; Samper, 2009).

Na maioria das espécies domésticas, a ovulação ocorre 24 a 40 horas após um pico ovulatório de LH. A égua é uma excepção, uma vez que a ovulação ocorre antes desse pico, quando os níveis de LH sanguíneo ainda estão a aumentar, dando-se esse pico aproximadamente 48 horas após a ovulação (Blanchard *et al.*, 2003; Pineda & Dooley, 2003; Ginther *et al.*, 2008a).

A ovulação é um processo no qual há a ruptura da parede do folículo na região da fossa ovulatória, permitindo que o fluído folicular, células da granulosa e o oócito sejam libertados. Consequentemente, vai haver um colapso da parede folicular, que passará a poder ser sentido à palpação rectal como uma cratera ou fosso na localização do folículo, ou visto em ultra-sonografia como uma zona hiperecogénica, denominando-se de corpo lúteo (Samper, 2009).

As alterações nos níveis hormonais que ocorrem durante o ciclo éstrico podem ser vistas na figura2.

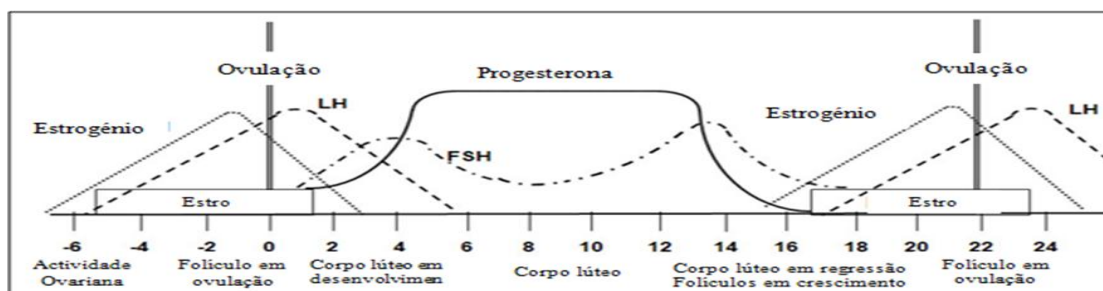


Figura 2 - Níveis hormonais e correspondente actividade ovárica ao longo do ciclo éstrico (adaptado de Taylor-MacAllister & Freeman, 2007)

1.2 Sazonalidade Reprodutiva

As éguas são poliéstricas sazonais, o que significa que apenas apresentam ciclos éstricos numa determinada altura do ano (Pineda & Dooley, 2003; Crowell-Davis, 2007; Taylor-MacAllister & Freeman, 2007; Chemineau *et al.*, 2008; Cuervo-Arango & Clark, 2010). Esta ciclicidade reprodutiva é uma consequência do efeito do

aumento da duração de horas de luz dos dias sobre o SNC que, devido ao aumento das horas de luz, vai actuar sobre a hipófise que, por sua vez, menos melatonina vai secretar. A diminuição da secreção de melatonina vai actuar no hipotálamo, resultando num aumento na síntese e secreção de GnRH, que por sua vez, vai actuar sobre a hipófise estimulando a síntese e secreção de gonadotrofinas (hormonas que actuam nas gonadas masculinas e femininas estimulando a secreção de estrogénio, progesterona e testosterona), nomeadamente a LH e também a FSH. As gonadotrofinas, ao alcançarem os ovários, vão estimular o crescimento folicular e, consequentemente, a ovulação (Parkes, 1962; Pineda & Dooley, 2003; Crowell-Davis, 2007; Chemineau *et al.*, 2008; Ginther *et al.*, 2008b; Cuervo-Arango & Clark, 2010). Assim, o sinal hormonal dado pela melatonina inicia uma cadeia de acontecimentos que afectam directa e indirectamente o hipotálamo e a produção de GnRH, a hipófise e a produção de FSH e LH e, consequentemente, o desenvolvimento ovário e folicular, esteroidogénese e ovulação (Blanchard *et al.*, 2003; Samper, 2009).

Devido a tudo isto, no hemisfério norte, a altura do ano em que as éguas começam a estar receptivas ao garanhão é no início da primavera, particularmente nos meses de Abril a Outubro (época reprodutiva ou ovulatória), sendo que de Fevereiro a Abril e de Setembro a Novembro estão em períodos de transição (de Primavera e de Outono respectivamente) tendo ciclos éstricos irregulares com elevada incidência de folículos dominantes em regressão (Cuervo-Arango & Clark, 2010). Nos meses de Dezembro a Fevereiro a égua encontra-se em anestro. (figura 3)

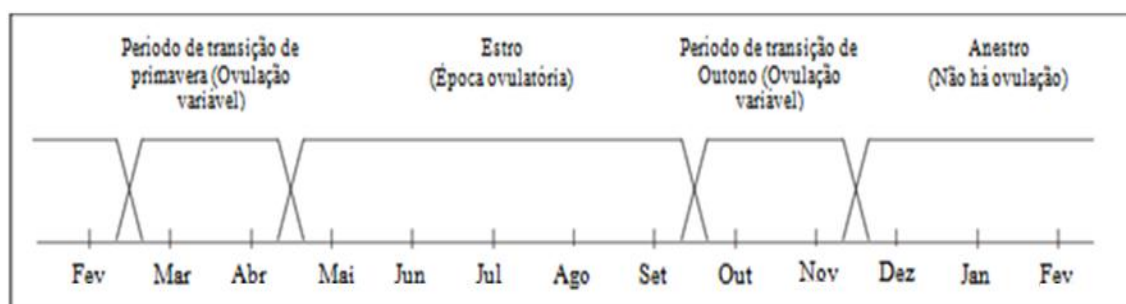


Figura 3 - Sazonalidade das éguas ao longo do ano (adaptado de Taylor-MacAllister & Freeman, 2007)

1.3 O Ciclo éstrico

O ciclo éstrico tem uma duração média de 22 dias. Em termos comportamentais, divide-se em duas fases: estro e diestro, que correspondem

fisiologicamente às fases folicular e lútea, respectivamente. A duração do estro é bastante variável, o que torna complicada a sincronização de ovulações para propósitos de manejo reprodutivo e em programas de transferência de embriões. Normalmente dura entre 5 a 9 dias, durante os quais a égua se mostra receptiva ao garanhão (devido aos efeitos de uma crescente concentração de estrogénios, principalmente estradiol). Este comportamento torna-se mais marcado à medida que se aproxima o momento da ovulação, devendo começar a diminuir após o pico da concentração de estradiol, 1 a 2 dias antes da ovulação. Contudo, este comportamento pode manter-se durante 1 a 2 dias pós-ovulação (Pineda & Dooley, 2003; Crowell-Davis, 2007; Pycock, 2008a; Samper, 2009).

Após a ovulação, o aumento gradual da concentração de progesterona em circulação, associado ao desenvolvimento do corpo lúteo é responsável pela supressão do comportamento de estro (Pineda & Dooley, 2003; Vanderwall *et al.*, 2007). O diestro tem por norma uma duração menos variável, entre 14 e 17 dias, durante os quais a égua não se mostra receptiva ao garanhão (Crowell-Davis, 2007; Pycock, 2008a; Samper, 2009).

O rufiamento tradicional (apresentação de um garanhão à égua para se observar o seu comportamento) continua a ser a peça chave do manejo reprodutivo em muitas coudelarias, apesar de se estar a desenvolver uma tendência para se confiar em exames veterinários, especialmente nas coudelarias que utilizam IA e optam por não manter nenhum garanhão ou macho vasectomizado para rufiar (Pycock, 2008a).

Uma égua com comportamento típico de estro, ao ser rufiada, será submissa ao avanço do garanhão, com as orelhas para a frente, inclinando-se na direcção do garanhão, urinando várias vezes à sua frente, fazendo frequentemente eversão do clitóris com libertação de pingas de urina - “winking”, flexão dos curvilhões e destacando a cauda. Em contraste, uma égua em diestro apresentará um comportamento agressivo, com as orelhas para trás, guinchando e escoiceando na direcção do garanhão (Crowell-Davis, 2007; Ricketts, 2008a).

Actualmente, há uma tendência para se recorrer a técnicas de cobrição natural e de reprodução assistida que necessitem da manipulação do estro e da ovulação. A terapia hormonal na égua é utilizada primariamente para induzir e manusear o início da época reprodutiva, programar as cobrições naturais através da indução do estro e da

ovulação, implementar procedimentos reprodutivos assistidos e atrasar ou suprimir o estro e o seu comportamento típico (Pineda & Dooley, 2003; Samper, 2009).

1.4 Gestação

A gestação é um processo que envolve o reconhecimento materno da gestação e a implantação, sendo que o reconhecimento materno da gestação pode ser definido como o processo fisiológico através do qual as estruturas embrionárias sinalizam a sua presença, prolongando consequentemente a duração do corpo lúteo (Ginther, 1998; Spencer *et al.*, 2004).

A ocorrência e manutenção da gestação resultam:

- da sinalização pelo conceito (embrião/feto e membranas extraembrionárias associadas), que se fixa na base de um dos cornos uterinos ao dia 16 pós-ovulação;
- da progesterona produzida pelo corpo lúteo;
- de outras hormonas secretadas pela placenta que vão actuar no útero regulando as funções e diferenciação endometrial;
- do sinal de reconhecimento da gestação;
- da receptividade uterina para a implantação do conceito;
- das interações entre o útero e as estruturas embrionárias (Ginther, 1998; Spencer *et al.*, 2004; Quinn *et al.*, 2007; Rambags *et al.* 2008; Allen & Wilsher, 2009; Noakes, 2009).

A manutenção da gestação necessita de acções recíprocas entre o conceito e o endométrio. Actualmente defende-se que as hormonas placentárias actuam directamente no endométrio uterino para regular a diferenciação celular e a sua função. Assim, a progesterona desempenha um papel indisputável no estabelecimento e manutenção da gestação em mamíferos (Spencer *et al.*, 2004; Rambags *et al.* 2008; Allen & Wilsher, 2009; Gaivão & Stout, 2012).

Se uma égua apresenta um ciclo éstrico normal e consegue ficar gestante então a sinalização desde o cérebro até ao ovário aconteceu, pelo que, caso perca o embrião, entre os 35 dias e os 4 meses de gestação, o mais provável é a causa encontrar-se no próprio trato reprodutivo. Nestes casos é necessário um exame minucioso da genitália externa e do trato reprodutivo para identificar a causa do problema (LeBlanc, 2004).

1.5 Avaliação do aparelho reprodutor da égua

Os Médicos Veterinários de equinos estão bem conscientes do papel de extrema importância que o ambiente e o manejo têm no que diz respeito à reprodução de equinos, relativamente a qualquer programa de manejo reprodutivo que se possa implementar (Samper, 2009).

Ao examinar o sistema reprodutivo da égua, devemos tomar em consideração diversos parâmetros, sendo que a ajuda diagnóstica mais específica vai ser determinada pela história e achados iniciais (Rose & Hodgson, 1993).

1.5.1 História

A história reprodutiva da égua é sempre um dos aspectos principais aos quais os Médicos Veterinários dão relevância. No entanto existem diversos outros factores que podem ser importantes relativamente à performance reprodutiva da égua, desde o historial sanitário, problemas médicos anteriores até à própria alimentação da égua (Rose & Hodgson, 1993; Samper, 2009).

Os seguintes aspectos têm relevância na performance reprodutiva:

- Idade
- Número de potros nascidos (com sucesso)
- Número de gestações anteriores
- Abortos, mortes embrionárias precoces, gestações gemelares, mortes neo-natais
- História de distócias / lesões de poldros
- Detalhes de ciclos éstricos anteriores
- Duração do estro
- Maneira como se reproduziu: cobrição natural, inseminação artificial (sêmen fresco, refrigerado ou congelado)
- Época do cobrição relativamente à altura do ano ou à ovulação
- Número de cobrições antes da égua falhar o retorno ao cio
- Historial de descargas vulvares
- Historial de acumulação de fluidos no útero após reprodução
- Existência de um percurso de competição e altura em que acabou a sua carreira desportiva
- Fármacos administrados durante a sua carreira
- História de claudicações e cólicas

- Conhecimento da fertilidade do garanhão utilizado para a cobertura
- Nível de manejo a que a égua foi sujeita (Rose & Hodgson, 1993; Ricketts, 2008a; Samper, 2009).

Assim, o Médico Veterinário deve conhecer detalhadamente o historial de cada égua e, caso a história pregressa sugira que a égua teve dificuldades em se reproduzir em anos anteriores, deve ser incluído um historial médico completo, incluindo detalhes de pesquisa de patologias e tratamentos efectuados (Rose & Hodgson, 1993; Ricketts, 2008a).

1.5.2 Registos

Para se fazer um bom trabalho em reprodução de equinos é necessário manter um sistema de registos preciso e simples, que faculte uma consulta rápida de diversos aspectos, nomeadamente o estado dos ovários, tamanho dos folículos, aparência do cérvix, cor das descargas, entre outros (Rose & Hodgson, 1993; Blanchard *et al.*, 2003). Éguas que tenham dificuldades em ficar gestantes podem necessitar de vários exames ao longo de uma época reprodutiva. Nestes casos, é particularmente importante a manutenção de registos precisos que permitam que sejam feitas comparações entre os exames ao longo da época (Rose & Hodgson, 1993).

1.5.3 Examinação da Genitália Externa

A conformação do períneo da égua e a capacidade de encerramento dos lábios da vulva são avaliados para procurar sinais ou predisposição para pneumovagina e indicações para cirurgia vulvar correctiva (Blanchard *et al.*, 2003; Ricketts, 2008a; McKinnon *et al.*, 2011). Os lábios da vulva devem ser examinados em procura de quaisquer sinais de lacerações ou da cirurgia de Caslick (procedimento através do qual o Médico Veterinário sutura a parte superior dos lábios vulvares, juntando-os para prevenir contaminação vulvar e posteriores infecções). Assim, tanto o ânus como a vulva devem estar situados no mesmo plano, uma vez que uma vulva mais proeminente e/ou um ânus mais afundado faz com que a égua esteja mais propensa a infecções ascendentes, resultantes de pneumovagina e de contaminação fecal (Rose & Hodgson, 1993; Blanchard *et al.*, 2003; Samper, 2009).

Para além disto, deve-se ainda verificar a integridade do esfíncter vestíbulo-vaginal. Para isto deve-se afastar ligeiramente os lábios da vulva, sendo que o esfíncter

se encontra intacto quando não se verifica a entrada de ar (Rose & Hodgson, 1993; Blanchard *et al.*, 2003; Samper, 2009).

Deve-se sempre inspeccionar a zona do clítoris pois pode actuar como reservatório de agentes de Metrite Contagiosa Equina (MCE), devendo fazer-se cultura desta zona caso se suspeite de infecção. Nesta região também se alojam bactérias responsáveis por endometrite, sendo que o Médico Veterinário pode causar uma infecção uterina iatrogénica devido à passagem repetida do braço nesta zona, aquando da palpação vaginal (Rose & Hodgson, 1993; Blanchard *et al.*, 2003; Samper, 2009).

1.5.4 Exame Visual da Vagina e Cérvix

O exame desta região vai permitir observar quaisquer problemas mas também avaliar modificações associadas a diversas fases do ciclo éstrico. Isto é essencial para garantirmos a integridade do cérvix, assegurarmos que a gestação pode ser levada a termo e precavermos qualquer problema que possa surgir durante a gestação ou o parto (Blanchard *et al.*, 2003; Ricketts, 2008a). Antes de se fazer um exame interno deve-se desinfetar a vulva para prevenir a entrada de agentes infecciosos, tendo contudo o cuidado de não exagerar para não danificar a flora comensal desta região anatómica. Para proceder a esta desinfecção pode-se usar clorexidina ou sabão azul e branco (Blanchard *et al.*, 2003; Ricketts, 2008a).

Deve-se examinar a vagina num local abrigado da luz solar directa, utilizando um espéculo estéril, que é inserido no vestíbulo enquanto se utiliza a outra mão para afastar os lábios da vulva. Caso o espéculo deslize facilmente para a vagina anterior, isso significa que a integridade do selo vestíbulo-vaginal (a segunda barreira anatómica contra infecções ascendentes) foi perdida. Assim que o espéculo penetra na vagina anterior, é possível visualizar qualquer descarga purulenta que possa existir, lesão cervical, ou sedimento urinário. (Rose & Hodgson, 1993; Blanchard *et al.*, 2003; Samper, 2009). A aparência do cérvix muda ao longo do ciclo éstrico, devido a influência hormonal, como se pode ver na tabela 1:

Tabela 1 - Alterações cervicais e vaginais durante as diferentes fases do ciclo éstrico

Diestro	Mucosa cervical e vaginal: pálida e seca. Membranas com uma cor acinzentada, com regiões amareladas. A região cervical externa projecta-se para a vagina cranial e contrai-se bastante, ficando alta, seca e apertada (“botão de rosa”).
Estro	Superfícies da mucosa do cérvix e da vagina estão brilhantes devido às secreções mucosas. Perto da ovulação, o cérvix encontra-se congestionado, húmido e no chão da vagina.
Anestro	A cor do cérvix e da vagina é pálida, quase branca. O cérvix está atónico e flácido, abrindo-se por vezes e revelando lúmen uterino.

Adaptado de Rose & Hodgson, 1993; Blanchard *et al.*, 2003; Noakes, 2009; Samper, 2009

A avaliação da cor do cérvix tem de ser feita rapidamente após a inserção do espéculo pois assim que o ar entra em contacto com os tecidos, estes mudam rapidamente de cor. Através da vaginoscopia podemos também detectar fístulas rectovaginais (presença de líquido esverdeado nesta região), hímen persistente (caso uma égua nulípara tenha o hímen intacto o espéculo não poderá avançar para a vagina) e vaginite necrótica (sequela de distócia que pode colocar em risco a vida da égua). Neste caso, será possível observar, ao exame com espéculo, paredes vaginais com uma cor preta acinzentada, necróticas ou granulomatosas e, aquando da passagem do espéculo, haverá na vagina um odor desagradável, podre e putrefacto (Rose & Hodgson, 1993; Blanchard *et al.*, 2003; Samper, 2009).

A palpação directa do cérvix permite avaliar a integridade cervical e identificar quaisquer adesões. Deve-se palpar todo o canal cervical (Rose & Hodgson, 1993; Blanchard *et al.*, 2003).

1.5.5 Exame Rectal

A palpação rectal é a principal técnica utilizada para avaliar o aparelho reprodutor (cérvix, útero e ovários) e diagnosticar uma eventual gestação. É uma técnica que acarreta alguns riscos pois pode acontecer ruptura da mucosa rectal, especialmente em éguas nervosas, irritáveis ou problemáticas. Assim, para evitar que isto aconteça, deve-se proceder ao exame com a égua devidamente contida e com a mão e braço bem lubrificados (Blanchard *et al.*, 2003; Samper, 2009). Nalgumas éguas pode mesmo ser

necessária contenção química. Quando se utilizar xilazina ou detomidina deve ser utilizado outro opióide ou agente anestésico em combinação, pois estes dois agentes podem causar hipersensibilidade nos membros posteriores e tornar a égua irrequieta, fazendo-a escoicear bastante (Rose & Hodgson, 1993; Blanchard *et al.*, 2003).

O exame deve ser feito começando por colocar bastante quantidade de lubrificante na mão e os dedos da mão juntos, em forma de cone. Quando a mão atinge o recto, deve ser feita uma pausa, de forma a deixar a égua relaxar. (Rose & Hodgson, 1993; Blanchard *et al.*, 2003). Depois, devemos remover as fezes presentes no recto. Após remoção das fezes, devemos voltar a aplicar lubrificante e reinserir a mão, removendo fezes que tenham ficado para trás. Vai-se avançando com o braço cranialmente e, caso se encontre resistência ou tensão, não se deve avançar mais, uma vez que a maior parte das rupturas rectais ocorrem quando se força o braço cranialmente quando há contracção/tensão da musculatura (Rose & Hodgson, 1993; Blanchard *et al.*, 2003; Samper, 2009).

1.5.5.1 Palpação dos ovários

Deve-se adoptar um exame sistemático, começando por localizar e avaliar um dos ovários (normalmente o oposto ao braço utilizado) e seguindo ao longo do útero para o ovário contralateral. Os ovários (aproximadamente 4-8 cm de comprimento x 3-6 cm de largura x 3-5 cm de altura; Samper, 2009) estão ligados à parede abdominal e pélvica através do ligamento largo, podendo ser encontrados utilizando o íleo como ponto de referência. O ovário esquerdo é normalmente mais caudal. A única estrutura normal que poderá ser confundida com um ovário é uma bola fecal no cólon menor (Rose & Hodgson, 1993).

Durante o inverno, e até ao início da primavera, a generalidade das éguas encontram-se em anestro e os ovários são pequenos, com cerca de 3 cm de diâmetro. Quando a égua começa a ciclar, durante a primavera, os ovários podem atingir até mais do dobro do seu tamanho inicial. Durante o estro os ovários podem medir entre 4-8cm e pode-se detectar um ou mais folículos através da manipulação digital (Ricketts, 2008a).

Pode-se agarrar um ovário entre o polegar e o indicador para determinar o tamanho do folículo (entre 1,5 e 6 cm) e a sua turgescência. O desenvolvimento folicular nos ovários compreende folículos em crescimento, em ovulação e em regressão ou anovulatórios hemorrágicos (Donadeu & Pederson, 2008; Samper, 2009). No início

do desenvolvimento folicular vamos ter vários folículos de dimensões semelhantes, que aumentam em média 2-4 mm por dia, até o maior folículo atingir 20-25 mm de diâmetro. Esta é a fase de crescimento comum, a partir da qual os folículos começam a regredir ou mantêm as suas dimensões, com exceção do de maiores dimensões, o folículo dominante (Blanchard *et al.*, 2003; Samper, 2009).

À medida que o estro avança os folículos maturam, devendo ficar salientes à superfície do ovário e aumentando para dimensões superiores a 3 cm (Ginther *et al.*, 2008b; Ricketts, 2008a) sendo que no primeiro ou segundo dia de estro, o folículo dominante deverá medir entre 25 a 30 mm de diâmetro, aumentando aproximadamente 3 mm diariamente até à ovulação (Rose & Hodgson, 1993; Blanchard *et al.*, 2003; Donadeu & Pedersen, 2008; Pycck, 2008a; Ginther *et al.*, 2008b).

De uma maneira geral, a ovulação ocorre quando o folículo dominante atinge cerca de 40 mm de diâmetro. No entanto, esta dimensão depende parcialmente da altura do ano, raça, tamanho da égua e número de folículos pré-ovulatórios (Samper, 2009), pelo que o folículo poderá ter entre 38 a 60 mm de diâmetro aquando da ovulação (Rose & Hodgson, 1993; Samper, 2009). A turgescência do folículo normalmente altera-se à medida que matura, passando de firme e com parede espessa, para flutuante e com uma parede fina no momento que precede a ovulação (Ricketts, 2008a). A determinação precisa do tamanho e turgescência do folículo é importante para determinar a iminência da ovulação, uma vez que quanto maior, mais flutuante e menos arredondado for o folículo, e mais fina a sua parede, mais perto da ovulação estará (Rose & Hodgson, 1993; Ginther *et al.*, 2007; Samper, 2009).

No entanto, nenhum destes dados é absoluto, pois uma égua mais nova é provável que ovule folículos mais pequenos do que uma égua múltipara, que vai ter ovários maiores, até porque existem diferenças nas concentrações hormonais e no crescimento folicular consoante a idade das éguas (Ginther *et al.*, 2008a).

Normalmente, na altura da ovulação, existe um colapso do folículo, que é sentido como uma cratera ou fosso na localização do folículo. Quando se palpa esta zona a égua irá responder à dor local através da tensão dos músculos do flanco ou levantando um membro posterior (Rose & Hodgson, 1993; Blanchard *et al.*, 2003). As bordas da cavidade que se forma na superfície do ovário aquando da ovulação são acentuadas e irão permanecer vazias durante cerca de 8 horas. À medida que a hemorragia resultante da ovulação forma um coágulo para formar o corpo hemorrágico,

a consistência da cavidade (até então mole) vai ficando mais firme até 24 horas após a ovulação (Rose & Hodgson, 1993; Blanchard *et al.*, 2003). Após 24 horas esta cavidade pode distender-se com o coágulo e soro, sugerindo à palpação a presença de outro folículo que não ovulou, de dimensões mais pequenas do que o folículo original. Estas alterações são mais facilmente e melhor avaliadas através de palpações rectais repetidas ou através de ultra-sonografia (Rose & Hodgson, 1993; Blanchard *et al.*, 2003; Ginther *et al.*, 2007; McKinnon *et al.*, 2011), sendo que esta última permite diferenciar entre um folículo que ovulou e foi preenchido por sangue, formando um corpo hemorrágico, ou um folículo que não ovulou, ficando cheio de sangue sem haver ruptura da parede folicular (corpo hemorrágico não ovulatório; Singh *et al.*, 2003; Ginther, 2009).

Se aos 14 dias pós-ovulação não houver um embrião viável no útero, o corpo lúteo sofre luteólise e vai regredir, devido à acção da Prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) (luteolisina natural na maioria das espécies domésticas) secretada pelo útero. A Oxitocina também pode estar associada à libertação de $PGF_{2\alpha}$ pelo útero, uma vez que quando administrada em diestro vai induzir a regressão lútea, diminuindo assim a duração do ciclo éstrico (Wenkoff, 1975; Neely *et al.*, 1979; Blanchard *et al.*, 2003; Pineda & Dooley, 2003; Vanderwall *et al.*, 2007; Ginther *et al.*, 2008a; Ginther, 2009; Ginther *et al.*, 2009; McKinnon *et al.*, 2011; Ginther, 2012).

1.5.5.2 Palpação do útero

O útero é palpado para determinar o seu tónus, tamanho e consistência. Para localizar o útero, o examinador avança entre 40 a 55 cm no recto e coloca a mão em forma de concha, dobrando os dedos, numa direcção caudal e ligeiramente ventral. Quando a mão se aproxima da pélvis, o útero deverá ser sentido como um tecido suave, friável e relativamente flácido (dependendo da fase do ciclo éstrico em que a égua se encontra), situado transversalmente no abdómen caudal (Rose & Hodgson, 1993).

O útero mede cerca de 18-20 cm de comprimento e 8-12 cm de diâmetro. Os cornos uterinos têm entre 20-25 cm de comprimento e 1-6 cm de diâmetro. Em éguas multíparas e mais velhas, o útero poderá ser encontrado ventralmente à pélvis, enquanto que em éguas jovens nulíparas, o útero poderá estar situado ligeiramente dorsal à pélvis. Consegue-se uma melhor impressão inicial relativamente ao tónus e tamanho do útero colocando os dedos “em concha” por cima da borda cranial do útero, com a palma da mão na região dorsal e deslocando a mão lateral e medialmente desde a ponta de um

corno uterino até ao outro (Rose & Hodgson, 1993; Samper, 2009; McKinnon *et al.*, 2011).

Durante o estro, o aumento da secreção de estrogénios estimula as células endometriais a aumentarem de tamanho e a demonstrarem uma intensa actividade mitótica. Simultaneamente, aumenta o suprimento sanguíneo do útero, proliferação celular e edema, o que leva a um ainda maior crescimento do endométrio, dando ao útero uma sensação de espessamento e, à palpação, tem-se a sensação que a parede espessada pode ser facilmente comprimida entre os dedos. Ocorrem alterações semelhantes na mucosa e musculatura do oviducto, mas que não são palpáveis (Rose & Hodgson, 1993; Pineda & Dooley, 2003).

Durante a fase lútea, o corpo lúteo começa a secretar progesterona e as células da superfície endometrial aumentam ainda mais as suas dimensões. Nesta fase as glândulas uterinas, devido à acção da progesterona, começam a secretar um material espesso para o lúmen uterino (“leite uterino”), e a camada sub-epitelial fica infiltrada de neutrófilos e eosinófilos. Ao mesmo tempo o edema diminui, fazendo com que o útero fique mais firme à palpação (Rose & Hodgson, 1993; Pineda & Dooley, 2003).

No final da fase folicular e início da fase lútea, bem como no fim da fase lútea e início da fase folicular subsequente, os órgãos reprodutivos reagem a uma transição da dominância de estrogénios para progesterona, e para estrogénios de novo, com alterações que reflectem a acção combinada de ambas as hormonas (Pineda & Dooley, 2003).

Em anestro, as células da superfície endometrial vão regredir nas duas dimensões, e o útero torna-se flácido, com parede fina e, muitas vezes, bastante indistinto, ou seja, difícil de palpar (Rose & Hodgson, 1993).

1.5.5.3 Cérvix

O cérvix é palpado pressionando-o firmemente com a ponta dos dedos contra a pélvis. Os efeitos do estrogénio e da progesterona no cérvix são similares aos que se encontram no útero. Estrogénios causam flacidez, encurtamento e edema cervical. Numa altura mais tardia do estro, antes da ovulação, o cérvix vai estar extremamente flácido, achatando-se prontamente contra a pélvis. O cérvix em diestro é longo, tubular e facilmente palpável. Em anestro o cérvix torna-se suave e indistinto (Rose & Hodgson, 1993; Pineda & Dooley, 2003; Samper, 2009).

As alterações tácteis e visuais que ocorrem no aparelho reprodutor da égua podem ser vistas na tabela 2.

Tabela 2 - Alterações tácteis e visuais da genitália tubular utilizando vários instrumentos e observação directa durante o ciclo éstrico da égua

Método de Exame	Genitália	Meio do Diestro	Estro		
			Início	Meio	Fim
Palpação Rectal	Útero	Espessura e tonicidade máximas	Tonicidade e espessura decrescentes →		
	Cérvix	Firme e Distinto	Começa a achatarse e espessura decrescente	Mais achatado, curto e largo	Indiscernível, muito achatado
Ultra-sonografia transrectal	Útero	Edema mínimo	Flexibilidade endometrial aumenta → Áreas anecogénicas indicam edema		
	Cérvix	Ecogénico	Aumento das áreas anecogénicas →		
Palpação Vaginal	Vagina	Seca	Aumento das secreções →		
	Cérvix	Firme, saliente	Espessura e tonicidade diminuem →		
	Entrada do cérvix	Difícil de dilatar	Facilidade em dilatar aumenta →		
			1 dedo	2 dedos	≥ 3 dedos
Espéculo ou endoscópio	Vagina e cérvix	Fluídos viscosos, paredes vaginais pegajosas	Aumento dos fluídos e diminuição da viscosidade →		
		Baço, amarelo-acinzentado	Rosa	Rosa brilhante	Encarnado
		Vascularização mínima	Aumento da vascularização →		
	Entrada do cérvix	Saliente, central, firme e encerrado	Mais descaída e aberta	Aberta, descaída	Quase ventral
Directa	Vulva / labia	Enrugada, pálida, seca	Aumento da suavidade, humidade e cor (vermelho) →		

Adaptado de Samper, 2009

1.5.5.4 Diagnóstico de gestação

Após a ovulação, e caso ocorra fertilização, poderemos detectar a vesícula embrionária, com 3 a 5 mm de diâmetro, em migração pelo útero, pela primeira vez, e através de ecografia, cerca dos 11 dias após a ovulação. Entre os dias 14-16 após a ovulação, a vesícula poderá ser visualizada como uma estrutura de aproximadamente 2 cm, cheia de fluido, com artefactos hiperecogénicos característicos e, por volta dos 16 dias após a ovulação, a vesícula fixa-se na base de um dos cornos uterinos (Bergfelt, *et al.*, 1998; Blanchard *et al.*, 2003; Meira *et al.*, 2012).

Cerca de 17 ou 18 dias pós-ovulação, há mudanças características no tónus uterino e cervical em éguas gestantes (aumento do tónus e tubularidade dos cornos uterinos, cérvix torna-se alongado, firme, fechado e proeminente) que podem ser utilizadas para diferenciar as éguas gestantes de éguas em diestro. A vesícula, com aproximadamente 19-24 mm perde a sua forma esférica (Rose & Hodgson, 1993; Bergfelt, *et al.*, 1998; Blanchard *et al.*, 2003; Pineda & Dooley, 2003; Noakes, 2009; Meira *et al.*, 2012).

Pelos 20 dias de gestação, a vesícula, com 3 a 4 cm de diâmetro é palpável na base de um dos cornos uterinos e começa a ver-se na parte ventral da vesícula o esboço do embrião, que se localizará a meio da vesícula pelos 25 dias de gestação e na parte dorsal da vesícula aos 30 dias de gestação. Por volta dos 30 dias de gestação a vesícula tem entre 4 a 5 cm de diâmetro (ver tabela 3; Davies Morel, 2008). Após 35 dias de gestação a vesícula emite células trofoblásticas que invadem o endométrio materno, formando taças endometriais, que vão libertar Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) até aos 120-140 dias de gestação. A eCG vai ter uma acção predominantemente semelhante à LH, tendo o seu pico de secreção entre o dia 55-70 de gestação (Pineda & Dooley, 2003; Noakes, 2009; Meira *et al.*, 2012).

Tabela 3 - Diâmetro da vesícula embrionária numa fase inicial da gestação

Tempo de gestação (dias)	Tamanho da vesícula embrionária (diâmetro, em mm)
15	15-20
20	30-40
30	40-50
40	65
50	80
60	100-130

Adaptado de Bergfelt, *et al.*, 1998; Davies Morel, 2008

Os achados ultrassonográficos consoante o dia pós-ovulação em que a égua se encontra estão descritos na tabela 4.

Tabela 4 - Achados ultra-sonográficos consoante os dias pós-ovulação

Dias pós-ovulação	Achados Ultrassonográficos
11	Primeira detecção da vesícula embrionária, com 3-5 mm de diâmetro
11-14	Migração trans-uterina
15-16	Fixação na base de um dos cornos uterinos
17-19	Vesícula embrionária perde a sua forma esférica
20-21	Embrião visível no pólo ventral da vesícula embrionária
24-26	Batimento cardíaco; Saco Alantóide preenche 25% e saco vitelino preenche 75% da vesícula embrionária
28-30	Saco alantóide e saco vitelino preenchem cada um aproximadamente 50% da vesícula embrionária
34-36	Saco alantóide preenche cerca de 75% e saco vitelino 25% da vesícula embrionária
38-40	Embrião visível no pólo dorsal da vesícula embrionária. Saco alantóide preenche aproximadamente 100% da vesícula embrionária
45-50	Feto visível no pólo ventral da vesícula embrionária
60-70	Possível fazer a determinação do sexo do feto

Adaptado de Betteridge *et al.*, 1982; Bergfelt *et al.*, 1998; Blanchard *et al.*, 2003 ; Caixeta *et al.*, 2008 ; Meira *et al.* 2012

Para além de palpação rectal e ultra-sonografia, existem diversos métodos de avaliação para confirmar se uma égua se encontra gestante ou não. Alguns dos métodos permitem fazer um diagnóstico mais preciso do que outros, conforme se pode ver na tabela 5.

Tabela 5- Diferentes métodos de diagnóstico de gestação

Método de diagnóstico	Dias pós-ovulação	Achados
Avaliação do comportamento	16-20	Uma égua que não esteja gestante deverá demonstrar comportamento de estro por esta altura. É um indicador de gestação não específico.
Exame vaginal com espécúlo	18-21	Não é aconselhado, excepto se a avaliação transrectal não for conclusiva. Cérvix seco, pálido, bem fechado é sugestivo de gestação. É um indicador de gestação não específico, sugerindo apenas a presença de um corpo lúteo funcional.
Mensuração de progesterona no leite/soro	18-20	Elevados níveis de progesterona sugerem a presença de um corpo lúteo funcional, e, consequentemente, de uma gestação. É um indicador de gestação não específico.
Mensuração de eCG no soro	40-80/120	Existência de níveis sanguíneos de eCG detectáveis (os níveis de eCG produzidos variam muito de égua para égua).
Mensuração de estrogénios placentários	A partir do dia 65	É possível medir os níveis séricos de sulfato de estrona, que aumentam progressivamente, atingindo um pico por volta dos 200 dias pós-ovulação, permanecendo nesse patamar até ao dia 300 pós-ovulação. É um teste confiável que pode ser executado a partir de uma amostra de fezes, e é um bom indicador da viabilidade fetal, contudo a sua utilidade é limitada devido a apenas ser confiável quando a gestação já se encontra adiantada.
Palpação rectal	18-20 (Gestação recente)	Aumento do tónus e tubularidade dos cornos uterinos. Actividade folicular muito pronunciada, cérvix alongado, firme, fechado e proeminente.
	25-30	Achados da palpação aos 18-20 dias ainda presentes. Detecção de uma estrutura oval resistente (tamanho de uma bola de golfe) no aspecto anteroventral do corno uterino.
	35-40	Achados anteriores ainda presentes. Estrutura oval tem agora as dimensões de uma bola de ténis.
	45-50	Achados anteriores, mas as dimensões da estrutura são agora maiores ocupando a mão toda. Parede uterina ventral mais fina e com mais fluido do que até então.
	60-65	Cérvix mantém-se alongado e firme, mas com menor tónus. O útero começa a deslocar-se para o abdómen ventral. A estrutura oval tem menos resistência.

Método de diagnóstico	Dias pós-ovulação	Achados
Palpação rectal (continuação)	100-120	Gestação contínua a sua expansão para o corpo uterino, sendo mais facilmente detectável neste do que no corno uterino. Gestação sentida mais dorsalmente do que anteriormente. A estrutura que se sente tem agora as dimensões de uma bola de basquete. Nesta fase é possível confundir uma bexiga cheia com uma gestação, por isso é necessário garantir que o fluído que sentimos está presente no útero (acompanhando o trajecto do órgão que se está a sentir até se alcançar o cérvix).
	150-210	A deslocação do útero para o abdómen ventral fica concluída nesta altura. O útero gestante tem um diâmetro demasiado elevado para poder ser sentido na sua totalidade através de palpação.
	240-termo (fase final da gestação)	O útero começa a expandir-se dorsalmente. Crescimento fetal ocorre principalmente nesta altura, pelo que começa a existir menos líquido e torna-se fácil sentir o feto. Uma estimação precisa da idade do feto é complicada.
Ultra-sonografia	10-12	Possível visualizar a vesícula embrionária
	15	Visualização da vesícula embrionária em aproximadamente 99% das gestações

Adaptado de Nagy *et al.*, 1998 ; Blanchard *et al.*, 2003

Depois de se averiguar o estado do trato genital, não convém fazer exames vaginoscópicos regulares de rotina, pois estes podem acabar por ser prejudiciais uma vez que ao expor a vagina, cérvix e útero ao ar podemos levar a que haja uma inflamação. Isto é algo que se torna mais notório em éguas mais velhas, uma vez que estas têm menor resistência à contaminação (McKinnon *et al.*, 2011).

1.6 Eficiência Reprodutiva

A eficiência reprodutiva pode ser aferida pela avaliação exaustiva de toda a informação referente ao garanhão, égua e ao manejo de ambos. Avaliar a eficiência reprodutiva na indústria de reprodução equina é um aspecto importante do manejo de rotina das éguas e dos garanhões (Ricketts; 2008b; Samper, 2009). Historicamente, determinar a eficiência reprodutiva restringe-se ao cálculo da taxa de gestação e à quantidade de ciclos/gestação, que são duas medidas que refletem a fertilidade média de um garanhão numa determinada época reprodutiva (Samper, 2009; Varner *et al.*, 2010).

Resumir a avaliação do sucesso de uma época reprodutiva somente a estes dois factores leva a crer que o único motivo para uma taxa de fertilidade reduzida se cinge ao garanhão, menosprezando outros factores, como a raça da égua e o maneio a que esteve submetida, entre outros (Samper, 2009).

Na realidade, há bastantes mais factores mensuráveis a ter em conta, tanto no que diz respeito à égua, como ao garanhão.

No caso do garanhão alguns dos factores a ter em conta são:

1. Qualidade do sémen;
2. Historial Clínico;
3. Condição física do garanhão (Metcalf, 2002 ; Sieme *et al.*, 2003; Pycock, 2008b; Varner *et al.*, 2010)

Relativamente à égua devemos considerar:

1. História reprodutiva da égua (nulípara, infértil ou com poldro);
2. Idade da égua;
3. Data do parto;
4. Intervalo entre estros (Metcalf, 2002; Ball, 2000; Ricketts, 2008b; McCue, 2009)

Para além destes aspectos, temos ainda de considerar o tipo de maneio das éguas antes e durante a época reprodutiva. (i.e. como é que se determinou a ovulação, quantas vezes as éguas foram inseminadas ou cobertas durante o ciclo; McCue, 2009; Samper, 2009).

A fertilidade média de um garanhão pode ser descrita através da determinação da taxa de fertilidade por época reprodutiva e dos ciclos por gestação (Samper, 2009; Varner *et al.*, 2010).

A taxa de fertilidade por época reprodutiva é uma percentagem baseada no número de éguas diagnosticadas como gestantes num ponto específico do tempo, a dividir pelo número de éguas que foram cobertas por esse garanhão até esse mesmo momento. Este valor é normalmente calculado após o término da época reprodutiva. É um importante factor económico, não sendo contudo um indicador sensível da taxa de fertilidade do garanhão. Assim sendo apesar de ser um importante factor económico, e aquele a que os proprietários mais estão familiarizados, não é um dos aspectos mais sensíveis quando se tenta descrever e identificar a origem de uma fertilidade reduzida (Pycock, 2008b; Samper, 2009; Varner *et al.*, 2010).

A quantidade de ciclos éstricos necessários para uma égua ficar gestante são um indicador mais sensível da fertilidade de um garanhão, uma vez que medem a eficiência de um garanhão para fazer com que uma égua fique gestante. Este valor é determinado através da contagem de todos os ciclos éstricos de todas as éguas que um garanhão cobriu, dividindo depois pelo número total de gestações. O número total de ciclos pode ser determinado contando todas as datas em que a égua foi coberta ou inseminada, excluindo cobrições/inseminações múltiplas num mesmo estro (Samper, 2009).

Assim, a taxa de fertilidade por época reprodutiva e os ciclos por gestação são os dois indicadores inicialmente mais utilizados quando se avalia a fertilidade do garanhão, mas são, contudo, médias sazonais que medem a fertilidade geral não só do garanhão, mas das éguas e do manejo também (Samper, 2009; Varner *et al.*, 2010).

Concluindo, alguns dos parâmetros que são então utilizados para medir a eficiência reprodutiva numa época reprodutiva são:

1. Taxa de fertilidade;
2. Taxa de gestação por ciclo
3. Taxa de gestação no fim da época reprodutiva
4. Taxa de poldros vivos no fim da época reprodutiva
5. Taxa de percas de gestação
6. Morte embrionária precoce (Ball, 2000; LeBlanc, 2004; Ricketts, 2008b; Samper, 2009; Varner *et al.*, 2010).

Desta forma, para se conseguir maximizar ao máximo a eficiência reprodutiva desenvolveram-se duas técnicas fundamentais, a transferência de embriões e a inseminação artificial (IA) que será posteriormente abordada.

1.7 Causas de sub-fertilidade

Na prática clínica, encontram-se frequentemente problemas reprodutivos. Uma égua “problemática” pode ser definida como:

1. Uma égua que não fica gestante após ter sido coberta/inseminada por um garanhão fértil em mais de 3 ciclos éstricos numa determinada época de cobrição;
2. Uma égua que não consegue levar a gestação a termo;
3. Uma égua com patologias reprodutivas conhecidas;

4. Uma égua com problemas comportamentais relacionados com a reprodução (Ricketts, 2008b; McCue, 2009)

Assim, um plano de diagnóstico sistemático e exaustivo deve ser delineado para cada uma destas éguas, sendo que o plano de diagnóstico deve incluir, mas não necessariamente limitar-se a:

1. Historial reprodutivo e resultados de exames ou procedimentos anteriores;
2. Exame físico da égua;
3. Comportamento de rufiar;
4. Avaliação da conformação perineal;
5. Palpação rectal do trato reprodutivo;
6. Ultra-sonografia transrectal do trato reprodutivo;
7. Exame com espéculo da cúpula vaginal e região cervical externa;
8. Exame do cérvix;
9. Cultura uterina (através de esfregaço, lavagem uterina de pequeno volume ou biópsia)
10. Citologia endometrial;
11. Biópsia endometrial;
12. Testes diagnósticos adicionais:
 - a. Endoscopia do lúmen uterino;
 - b. Testes endócrinos;
 - c. Cariótipo;
 - d. Laparoscopia;
 - e. Testes de obstrução do oviducto (Coutinho da Silva, 2008; Ricketts, 2008b; McCue, 2009).

Muito poucas éguas são permanente e completamente inférteis, mas sub-fertilidade de diversos graus é um grande problema (Ricketts, 2008b; Samper, 2009).

Estas éguas oferecem um desafio considerável e, como tal, uma também considerável oportunidade para os Médicos Veterinários, havendo algumas directrizes base disponíveis para uma interacção bem sucedida:

1. Dedicar o máximo possível de atenção individual a cada égua problema;
2. Manter o foco em cada égua problema diariamente (as situações podem mudar diariamente);
3. Fazer uma abordagem detalhada e orientada no diagnóstico e terapêutica:

4. Ser comprometido em ser bem sucedido e ser persistente;
5. Ser flexível e alterar o diagnóstico e/ou a terapêutica se indicado;
6. Estar disponível para dialogar com colegas;
7. Fornecer informações frequentes aos proprietários;
8. Ser optimista quando a situação parece complicada;
9. Ser contudo realista para o prognóstico, baseado num diagnóstico preciso e disponibilidade de perícia, opções terapêuticas e recursos económicos;
10. Saber quando desistir e/ou referenciar o caso (McCue, 2009)

É preciso ter em conta que há diversas causas de sub-fertilidade que fazem com que uma égua seja categorizada como égua “problemática” e, apesar de ser importante reconhecer a causa disso, é igualmente importante a implementação de uma estratégia de tratamento de sucesso (Coutinho da Silva, 2008).

A ocorrência de diversos problemas reprodutivos que podem afectar as éguas pode ser prevista baseado em diversos factores:

1. Idade da égua (p. ex. éguas mais velhas mais propensas a endometrite);
2. Raça (p. ex. pobre conformação perineal em puros sangue);
3. Número de partos (p. ex. fraca função cervical em éguas mais velhas nulíparas; Coutinho da Silva, 2008; McCue, 2009).

Existem, contudo, patologias reprodutivas menos comuns mais difíceis de diagnosticar. Idealmente, todas as éguas sem poldros ou que aparentassem não ser férteis, deveriam ser examinadas no final da época reprodutiva enquanto ainda estão cíclicas, por forma a poder ser efectuado um diagnóstico das causas de fertilidade reduzida, implementar-se um plano terapêutico e verificar a resposta a esse mesmo plano, sendo o ideal que se conseguisse identificar e resolver o problema reprodutivo antes do final da época. No entanto, também se pode realizar a avaliação da égua no início da época reprodutiva ou inclusive a meio da mesma (Coutinho da Silva, 2008; McCue, 2009).

O diagnóstico preciso de um problema é um pré-requisito para o desenvolvimento de um programa de tratamento racional e a instituição de uma estratégia de manejo adequada (Samper *et al.*, 2007; McCue, 2009).

Deve-se desenvolver um programa terapêutico lógico para as éguas problema, com estratégias de tratamento específicas dependentes dos resultados dos testes diagnóstico. É também aconselhável ter um ou dois planos de apoio secundários para o

caso do primeiro não ser bem sucedido. Os objectivos primários são limitar o número de nascimentos a um por ciclo, cobrir/inseminar a égua o mais perto da ovulação possível e facilitar a eliminação física do fluido intra-uterino, espermatozóides e restos inflamatórios após a cobertura/inseminação (LeBlanc, 2008; McCue, 2009; Samper, 2009).

Um plano terapêutico genérico para uma égua problema pode ser semelhante ao seguinte, com modificações consoante o diagnóstico de um problema específico:

1. Monitorização precisa do ciclo éstrico através de rufamento, palpação rectal e ou ultra-sonografia (sendo estes últimos os métodos mais precisos);
2. Optimização do manejo reprodutivo:
 - a. Aconselhar o proprietário a utilizar o garanhão mais fértil dentro dos que o dono pretende;
 - b. Inseminar com sémen fresco se possível, estando o sémen refrigerado como segunda escolha e o sémen congelado apenas como derradeira alternativa;
 - c. Se o mesmo garanhão tiver sido utilizado em múltiplos ciclos sem sucesso, mudar de garanhão.
3. Administrar hCG ou um agonista da GnRH para se conseguir prever com mais exactidão a altura da ovulação;
4. Cobrir ou inseminar apenas uma vez, o mais perto possível da ovulação;
5. Reproduzir através de inseminação artificial (se permitido pelo registo da raça) e fazê-lo com uma higiene rigorosa;
6. Efectuar lavagem uterina com uma solução salina estéril ou lactato de Ringer, 4 a 6 horas após inseminação ou cobertura;
7. Administrar oxitocina e/ou prostaglandinas para limpeza uterina pós-cobertura/inseminação;
8. Confirmar que a ovulação ocorreu como previsto através de exame ultrassonográfico;
9. Fazer monitorização ultrassonográfica do útero nos dias seguintes para verificar se há acumulação de fluídos;
10. Considerações adicionais (caso sejam indicadas):
 - a. Lavagem uterina antes da cobertura/inseminação;

- b. Administração de antibióticos intra-uterinos antes e/ou depois da cobrição/inseminação;
- c. Administrar progesterona suplementar;
- d. Vulvoplastia de Caslick;
- e. Outras terapias (tais como acupuntura, PGE, corticoesteróides, plasma; McCue, 2009)

É preciso também ter em consideração que podem ser necessários vários ciclos para se conseguir estabelecer uma gestação em éguas problema e, mesmo assim, existe uma probabilidade elevada de uma falha na gestação (Samper, 2009).

Assim, podemos verificar que uma das causas que pode diminuir a eficiência reprodutiva durante a época reprodutiva reside na própria égua e, de forma a poder detectar-se e prevenir esses problemas, deve-se seguir uma metodologia meticulosa e exaustiva, considerando cada uma das éguas como um indivíduo único e com diferentes particularidades, uma vez que só assim conseguiremos maximizar os resultados e alcançar as performances pretendidas. Outra possível causa de fertilidade reduzida reside no tipo de égua que se está a utilizar, pois utilizar uma égua com poldro, uma égua nulípara, ou uma égua infértil terá diferentes resultados (McCue, 2009).

O grupo das éguas inférteis contem éguas sem poldros mas que já foram reproduzidas, e normalmente têm fertilidade mais baixa que as outras. Podem ser éguas que não foram reproduzidas na época anterior, que são sub-férteis ou que abortaram (McCue, 2009).

As éguas com poldro em princípio terão uma fertilidade mais elevada, pois levaram recentemente a termo uma gestação. Temos contudo de ter outros cuidados, pois éguas demasiado ciosas com os seus poldros poderão estar sujeitas a maiores stresses durante os procedimentos (IA ou cobrição natural; McCue, 2009).

As éguas nulíparas são éguas que nunca levaram uma gestação a termo. Normalmente são éguas jovens mas também podem ser mais velhas, que nunca ficaram gestantes por opção do proprietário ou, por exemplo, devido à sua carreira desportiva. As éguas mais velhas são normalmente menos férteis do que as mais novas (Ricketts, 2008b; Samper, 2009). A idade das éguas é assim também um factor importante pois à medida que as éguas se aproximam dos 14 anos de idade, a fertilidade declina. Existem perdas de gestação em fases tardias da gestação em éguas mais idosas, no entanto a principal causa de fertilidade reduzida reside em perdas embrionárias precoces. Assim,

a taxa de fertilidade diminui, e a quantidade de perdas embrionárias aumenta, quanto mais idade as éguas tiverem (Ball, 2000; Samper, 2009).

Tudo isto nos leva a considerar então as éguas que, sendo capazes de ficar gestantes acabam por perder o embrião, pois há casos em que a taxa de fertilidade é similar em éguas sem problemas e em éguas sub-férteis, sendo que o que posteriormente causa uma diferença significativa na fertilidade e na performance reprodutiva são as perdas embrionárias (Ball, 1988; LeBlanc, 2004).

A manutenção de um estado inicial de gestação nas éguas necessita de um corpo lúteo funcional, para produção de progesterona e, consequente, fornecimento de um ambiente uterino adequado (McDowell *et al.*, 1988). Em éguas sem problemas, a estimativa de perda embrionária desde a fertilização até ao dia 50 situa-se nos 18%. Nas éguas sub-férteis este valor dispara para 80%, com a maioria das perdas embrionárias a ocorrerem antes do dia 14 de gestação (Ball, 1988). Em éguas mais velhas, a taxa de perda embrionária entre a fertilização e o dia 10 são da ordem dos 60 a 70%, enquanto que em éguas jovens saudáveis se situa nos 9% (Ball, 2000).

A elevada taxa de perda embrionária em éguas sub-férteis pode estar relacionada com defeitos embrionários, ambiente do oviducto ou ambiente uterino (Ball, 1988).

As perdas embrionárias após os 35 dias de gestação, e antes dos 4 meses de gestação devem-se essencialmente a:

- Falha das glândulas do endométrio – fibrose periglandular,
- Insuficiência lútea,
- Incompetência cervical,
- Lacunas linfáticas,
- Nutrição / cólicas / toxinas,
- Anormalidades cromossómicas,
- Endometrite (LeBlanc, 2004).

Os embriões do oviducto de éguas sub-férteis são menos viáveis que os de éguas normais, pelo que os defeitos embrionários são deveras importantes quando se fala de perda embrionária precoce em éguas sub-férteis. Estes defeitos podem ser inerentes ao embrião ou advir do ambiente inicial do oviducto (Ball, 1988; Ball, 2000; McCue, 2009).

Também o ambiente uterino se pode encontrar alterado em éguas com endometrite, pelo que esta pode ser considerada uma patologia que representa um factor importante das perdas embrionárias em algumas éguas, apesar de o impacto das alterações uterinas ser mais propenso a causar perda de gestação numa fase mais avançada desta (Ball, 1988; Ball, 2000). Existe uma maior susceptibilidade a endometrites de algumas éguas sub-férteis, o que pode resultar em perda embrionária secundária a uma endometrite pós cobrição natural que persista até ao embrião alcançar o útero 5 ou 6 dias pós-ovulação (Ball, 1988).

As diferentes causas que podem originar uma perda precoce de gestação encontram-se descritas na tabela 6.

Tabela 6- Causas de perda precoce de gestação

Causa	Comentário
Endometrite induzida por cobrição frequente (Atraso na limpeza uterina)	Demonstração inconsistente de inflamação torna o diagnóstico difícil; fluído no útero 24-48 horas após reprodução.
Falha das glândulas endometriais	Uma extensa fibrose periglandular detectada em biópsia está altamente correlacionada
Lacuna linfática	As éguas terminam a gestação entre o 40º e 90º dia se conceberem
Incompetência cervical	Pode haver perda da gestação numa fase mais inicial (45 a 90 dias) ou tardia (após 6 meses), dependendo da severidade das lesões
Insuficiência lútea	Provas irrisórias de que a suplementação com progesterona seja benéfica. Parece ser eficaz em casos de endotoxemia ou outras causas que levem a libertação sistémica de prostaglandina
Factores externos (Nutrição / stress / calor)	Difícil de documentar
Factores cromossómicos e genéticos	“Doença do ovulo velho” em éguas com mais de 18 anos de idade

Adaptado de LeBlanc, 2004

A progesterona é crítica para a sobrevivência embrionária, sendo que concentrações reduzidas de progesterona podem estar relacionadas com endometrites, falhas no reconhecimento materno da gestação ou insuficiência luteal. Antes dos 80 dias de gestação caso o corpo lúteo não consiga produzir progesterona suficiente ou caso os ovários sejam removidos, as éguas irão abortar (LeBlanc, 2004). Assim, pode ser

recomendado uma suplementação de progesterona nalgumas éguas, mas os valores de progesterona exógena para prevenir perda embrionária espontânea são ainda muito debatidos pois não existem ou ainda não foram testados. No entanto muitas vezes o clínico acaba por realizar a sua administração devido a pressão do cliente ou a histórias convincentes (Ball, 1988; LeBlanc, 2004). A suplementação com progesterona pode ser contra-indicada contudo em éguas com história de endometrite ou de lacuna linfática pois há dados que indicam que a progesterona pode agravar o problema (LeBlanc, 2004).

Para além destes factores temos também o factor do garanhão. As principais queixas dos proprietários neste caso residem na infertilidade ou sub-fertilidade, uma vez que a infertilidade nos garanhões corresponde a reduzidas taxas de concepção (60-65%) e significativas perdas financeiras (Murchie, 2005).

O diagnóstico da causa que leva um garanhão a ter uma reduzida taxa de fertilidade representa um problema complicado para os Médicos Veterinários, uma vez que existem diversos motivos para isto:

- Os donos podem não ter registos precisos,
- O garanhão pode ter mudado de proprietário,
- Pode não se conhecer o historial reprodutivo das éguas
- O manejo reprodutivo pode ser mal executado

Há diversos motivos que podem levar a que um garanhão tenha fertilidade reduzida, nomeadamente:

- Problemas comportamentais,
- Patologias testiculares,
- Anomalias escrotais,
- Anomalias penianas (Murchie, 2005)

Muitos destes problemas, se forem diagnosticados atempadamente e tratados adequadamente irão ter um prognóstico bastante positivo. No entanto, algumas patologias, como a degeneração testicular progressiva, não podem ser tratadas. Nestes casos o proprietário deve estar consciente do mau prognóstico (Murchie, 2005).

1.8 Cobrição Natural vs. Inseminação Artificial (IA)

Historicamente os garanhões reproduziam-se através de cobrição natural ou IA, mas utilizando em qualquer um dos casos sémen fresco, sem quaisquer tipo de alterações por refrigeração, congelação, ou armazenamento prolongado. O sémen de equinos já é congelado desde 1964 com uma qualidade aceitável (Stevens, 1969), mas nos últimos 15-20 anos aumentou consideravelmente a utilização de sémen refrigerado e congelado, o que levou a que alguns garanhões que eram considerados férteis anteriormente, tenham sofrido um declínio na fertilidade apresentada (Loomis, 2001b; Blanchard *et al*, 2003; Bolaños *et al.*, 2012).

Técnicas como a IA e a criopreservação de sémen revolucionaram a indústria de reprodução animal. Contudo, para se utilizar todo o seu potencial é necessário ter em conta todos os processos que ocorrem ao longo do trato reprodutor feminino, entre o momento da IA e a fertilização, por forma a não se impedir inadvertidamente ou contrariar processos fisiológicos normais (Loomis, 2001b; Morrell & Rodriguez-Martinez, 2010; Bolaños *et al.*, 2012).

Muitos dos proprietários seleccionam os garanhões com base na sua performance, capacidades físicas e pedigree, tendo em pouca consideração a eficiência reprodutiva, o que faz com que existam muitos garanhões utilizados com diminuta eficiência reprodutiva, uma vez que um determinado garanhão pode ser sub-fértil num programa de sémen refrigerado ou congelado, e exibir fertilidade normal aquando da sua utilização num programa reprodutivo de IA com sémen fresco ou de cobrição natural (Loomis, 2012).

Algumas das vantagens da cobrição natural relativamente à IA são:

1. As éguas são quase sempre expostas a um número elevado de espermatozóides e, conseqüentemente, assegura-se uma quantidade de espermatozóides adequada a ser depositada nos seus úteros,
2. As éguas estão em estro. Isto tem que acontecer se quisermos que o garanhão monte e cubra as éguas em segurança. Isto assegura que nenhuma das éguas seja reproduzida quando não estão em cio ou devido a pressão do proprietário quando podem ainda não estar preparadas,
3. O sémen não é manuseado e, conseqüentemente, não há possibilidade de que sémen de boa qualidade seja comprometido devido a más técnicas de manuseamento ou exposto a substâncias tóxicas,

4. Menos sistemas de manejo envolvidos no processo de reprodução. O alcance mundial do sémen refrigerado e congelado aumentou o número de indivíduos envolvidos nos processos e, assim, a fertilidade pode ser limitada pela utilização de animais com menor eficiência reprodutiva (Blanchard *et al.*, 2003; Samper, 2009).

O sucesso da IA depende em grande parte do conhecimento e experiência dos técnicos envolvidos (Blanchard *et al.*, 2003; Samper, 2009).

No entanto, a IA também apresenta diversas vantagens, que levaram a que cada vez mais seja um dos métodos preferidos:

1. Utilização mais eficiente do sémen do garanhão, ao permitir que com apenas uma colheita de sémen se possa dividir o ejaculado em várias doses,
2. A adição de antibióticos aos diluidores do sémen permite minimizar a transmissão de patologias venéreas da égua para o garanhão e do garanhão para a égua,
3. A utilização de um manequim para a recolha de sémen reduz o risco de lesões do garanhão e da égua,
4. A recolha de sémen com a vagina artificial permite avaliar a qualidade do sémen antes da inseminação e permite assim detectar eventuais problemas que possam afectar a fertilidade do garanhão,
5. Permite separar no tempo e no espaço a ejaculação da inseminação,
6. Permite uma maior protecção sanitária, limitando o contacto entre os animais e através de controlos sanitários aos garanhões e éguas,
7. Possibilita a utilização de sémen de garanhões que se encontram a grandes distâncias, sem implicar a deslocação do garanhão ou da égua, permitindo assim também a utilização de um maior pool genético (Sellers, 1983; Blanchard *et al.*, 2003; Pineda & Dooley, 2003; Bedford-Guaus, 2007; Taylor-MacAllister & Freeman, 2007; Ricketts, 2008a; Varner *et al.*, 2010; Bolaños *et al.*, 2012).

Cobrição Natural

Quando trabalhamos com cobrição natural, as éguas devem ser examinadas a intervalos de 48 horas enquanto se encontram em estro, de maneira a se conseguir prever o momento da ovulação e ser aconselhada a cobrição. Caso existam antecedentes de problemas ovulatórios na égua, ou se o sémen do garanhão tiver longevidade

diminuída, estas avaliações devem ser feitas a cada 24 horas, por forma a conseguir prever com maior exatidão a ovulação e otimizar os resultados (Blanchard *et al.*, 2003; Bedford-Guaus, 2007).

Quando se faz reprodução através de cobrição natural não é possível utilizar muitas das técnicas laboratoriais que poderiam ajudar a melhorar a performance dos garanhões, no entanto é possível implementar métodos para avaliar a fertilidade e, através da manutenção de registos específicos, estratégias para tentar melhorar a mesma (Varner *et al.*, 2010).

Inseminação Artificial

A IA é uma técnica de reprodução assistida que consiste resumidamente em recolher o sémen de um garanhão (pode ser recolhido em estação, através de um salto num manequim ou numa égua em estro), dividi-lo em doses (consoante a concentração, volume e motilidade do sémen), e seguidamente depositar cada dose no interior do útero das éguas em estro. Isto permite conseguir várias doses a partir de um único ejaculado, podendo consequentemente beneficiar múltiplas éguas com apenas um ejaculado (Sellers, 1983; Pineda & Dooley, 2003; Samper, 2009).

Para se poder pensar num programa de IA deve-se fazer a avaliação do sistema reprodutivo do garanhão para averiguar a sua fertilidade, verificando se o garanhão tem capacidades físicas para garantir sémen com espermatozóides viáveis e sem patologias, de forma a conseguir estabelecer gestações numa quantidade aceitável de éguas por época reprodutiva. Esta avaliação deve englobar a libido, capacidades reprodutivas e defeitos congénitos que possam ser transmitidos à descendência, bem como a qualidade do sémen ejaculado (Ley, 2004; Pycock, 2008b; Varner *et al.*, 2010).

Actualmente, muitos criadores recorrem à IA, devido a todas as vantagens apresentadas anteriormente (Sellers, 1983; Pineda & Dooley, 2003; Pycock, 2008b) e, em muitos países, a IA ultrapassou a cobrição natural como o método de reprodução das éguas (Kuisma *et al.*, 2006).

Para executar eficientemente um programa de IA é necessário avaliar bem diversos parâmetros, e o Médico Veterinário deve conhecer cada égua individualmente no que diz respeito ao seu comportamento cíclico, função ovárica e competência uterina (Taylor-MacAllister & Freeman, 2007; Ricketts, 2008a), e também considerar o

historial reprodutivo de cada um dos animais, o tipo de sémen mais adequado para se utilizar e a qualidade do sémen (Pycock, 2008a).

Para além da qualidade do sémen e do maneio, há outros factores que afectam o resultado da IA, como a dose de sémen utilizada, a altura da IA e o maneio e fertilidade das éguas (Ley, 2004; Kuisma *et al.*, 2006).

Hoje em dia, as técnicas de IA permitem obter resultados muito positivos, podendo o sémen utilizado ser fresco, refrigerado ou congelado, sendo este último o menos utilizado, devido a acarretar maiores custos e uma diminuição das taxas de fertilização (Pineda & Dooley, 2003; Kuisma *et al.*, 2006).

Para obter taxas de gestação por ciclo aceitáveis, a quantidade de espermatozóides com motilidade progressiva (PMS) recomendada por dose, é de 300 milhões em sémen fresco e de 250 milhões em sémen congelado, após descongelamento. Normalmente, as éguas num programa de IA são inseminadas com 200 a 500 milhões de PMS. Foi demonstrado que a inseminação com quantidades inferiores a 100 milhões de PMS resultou em taxas de gestação por ciclo insatisfatórias. A inseminação com 500 milhões foi durante anos aceite como a dose mínima para maximizar a fertilidade, mas foi demonstrado que a dose de inseminação necessária para alcançar a fertilização é um fenómeno que varia de macho para macho. No entanto, a utilização de uma dose mais elevada vai ajudar a assegurar que se alcançam taxas de gestações aceitáveis, uma vez que permite alguma margem de manobra para eventuais erros de avaliação e de manuseamento quando as condições de trabalho não são óptimas (Rose & Hodgson, 1993; Blanchard *et al.*, 2003; Samper *et al.*, 2007).

Actualmente há técnicas de inseminação com baixas doses: técnicas de inseminação guiadas pelo recto e técnicas histeroscópicas nas quais há visualização do oviducto, onde se vai depositar o sémen. Estes dois tipos de técnicas permitem utilizar valores de PMS na ordem dos 50 a 200 milhões (Samper *et al.*, 2007).

A quantidade de espermatozóides numa dose para inseminação é mais importante do que o volume inseminado. Apesar de se poderem utilizar maiores ou menores volumes, normalmente o volume situa-se entre 10 a 30 ml. A utilização de grandes volumes não é vantajosa, uma vez que uma grande parte se pode perder através do cérvix da égua, que se encontra dilatado, após a inseminação. Para se calcular o volume de inseminação (VI) pode-se utilizar uma fórmula matemática, dividindo a quantidade PMS que se pretende (100 a 500 milhões) pelo produto da concentração de

espermatozóides no sémen diluído (CE), com a percentagem de PMS no ejaculado (%PMS expressa em valor decimal):

$$VI \text{ (ml)} = \frac{\text{dose PMS}}{CE * \%PMS}$$

(Blanchard *et al.*, 2003)

Quando se utiliza IA, utilizam-se doses de sémen com concentrações inferiores de espermatozóides do que aquelas que estão normalmente presentes no ejaculado. O sémen é depositado no útero durante o estro. Uma vez o sémen depositado, é sujeito a mecanismos de selecção e interacções com o trato reprodutor feminino pelo que é essencial que o manuseamento antes da inseminação não comprometa as membranas dos espermatozóides, a motilidade ou a longevidade, uma vez que isto irá afectar a sua capacidade de progredirem no trato reprodutor feminino. Caso se esteja a utilizar sémen congelado, na qual é essencial a inseminação ser efectuada o mais perto possível da ovulação, deve-se avaliar a égua a intervalos de 6 horas (Kuisma *et al.*, 2006; Ricketts, 2008a; Morrel & Rodriguez-Martinez, 2010).

1.8.1 Sémen

Na maior parte dos ganhanhos consegue-se fazer facilmente a recolha de sémen independentemente da sua idade ou do método de reprodução utilizado anteriormente e o método de recolha de sémen mais utilizado é a vagina artificial. Deve-se ter em particular atenção que se o ganhão não tiver estado a ser utilizado para finalidades reprodutivas, a menos que se estabeleça adequadamente a qualidade do sémen, é fácil subestimar ou sobrestimar a qualidade do sémen ejaculado (Pycock, 2008b).

Avaliação e processamento do sémen

Após a recolha do sémen, deve-se separar o gel e colocar o resto do ejaculado num recipiente graduado (previamente aquecido em estufa a aproximadamente 38°C) e registar o volume de sémen recolhido, bem como a sua cor. Devemos também verificar a concentração (pode ser feito manualmente, através da utilização de um hematocítmetro, densímetro ou um espectrofotómetro). Seguidamente deve-se avaliar a percentagem de espermatozóides com motilidade progressiva, devendo-se para isso diluir o sémen com um diluidor adequado (INRA96, p.ex.), também previamente aquecido a aproximadamente 38°C, uma vez que no sémen não diluído os

espermatozóides tendem a aglutinar-se, tornando impossível fazer uma estimativa correcta (Katila, 1997; Blanchard *et al.* 2003; McKinnon *et al.*, 2011).

Deve-se sempre adicionar um diluidor ao sémen para se proceder a uma inseminação, de forma a maximizar a longevidade dos espermatozóides. Normalmente uma diluição de 1:1 ou 1:2 é o suficiente, desde que o sémen não fique armazenado à temperatura ambiente por um período superior a 2 horas (Katila, 1997; Blanchard *et al.* 2003).

A motilidade e a morfologia dos espermatozóides devem ser avaliadas microscopicamente, colocando uma gota de sémen numa lâmina previamente aquecida em estufa a 37-38°C. A concentração de espermatozóides no ejaculado pode ser calculada utilizando um hematocítmetro, um espectrofotómetro ou um densímetro, como referido anteriormente. O número total de espermatozóides, obtido através da multiplicação da concentração de espermatozóides pelo volume da amostra é um dos indicadores mais importantes para se estimar a fertilidade de um garanhão. A quantidade total de espermatozóides com motilidade progressiva é calculada multiplicando o volume pela concentração de espermatozóides por milímetro e pela motilidade estimada na amostra (Blanchard *et al.* 2003; Samper, 2009; McKinnon *et al.*, 2011).

Sémen fresco, refrigerado e congelado

A longevidade do sémen no sistema reprodutivo da égua é bastante variável. No caso da cobertura natural, pode ir desde 24 horas a 7 dias. A longevidade do sémen pode ser afectada pelos diferentes métodos de tratamento e armazenamento do sémen, assim, podemos considerar que temos três tipos de sémen para a IA:

- Sémen fresco – Utilizado para inseminação imediata, pode ser utilizado sem diluição, no entanto é preferível a utilização de um diluidor (INRA96, p.ex), se for utilizado mais de 10 minutos após a sua recolha
- Sémen refrigerado – Utilizado quando o sémen vai ser utilizado mais de 6 horas após a sua recolha. O sémen é diluído.
- Sémen Congelado – Permite o seu armazenamento durante anos, mas reduz a fertilidade do sémen

(Brinsko *et al.*, 2000; Blanchard *et al.*, 2003 ; Bedford-Guaus, 2007 ; Pycock, 2008a ; Samper, 2009)

De acordo com o tipo de sémen a ser utilizado, a dose de espermatozóides e o volume da dose para inseminação variam, como se pode verificar na tabela 7:

Tabela 7 - Recomendações para utilização dos diferentes tipos de sémen para IA

Sémen Fresco	Dose: mínimo de 300 milhões de PMS
Sémen Refrigerado (utilização entre 6 a 12 horas após colheita)	Dose: mínimo de 300 milhões de PMS na altura da diluição Inseminação 6-12 horas após a colheita Percentagem de PMS na altura da inseminação não deve ser inferior a 35%
Sémen Refrigerado (utilização entre 24 a 36 horas após recolha)	Dose: mínimo de 600 milhões de PMS na altura da diluição Volume máximo de 40 ml (diluição de 1:2) Inseminação 24-36 horas após a colheita Percentagem de PMS na altura da inseminação não deve ser inferior a 35%
Sémen congelado	Dose: mínimo de 35% de PMS após descongelação Mínimo de 250 milhões de PMS por dose para IA após descongelação Volume da dose: depende do processo de congelamento Uma dose para inseminação de uma égua tem que ter no mínimo 3 palhinhas

Adaptado de Sieme *et al.*, 2004; Pycock, 2008a; Samper, 2009

Taxas de fertilidade

Sémen Fresco

O sémen fresco apresenta taxas de fertilidade mais elevadas do que o sémen congelado podendo, com técnicas correctas, alcançar uma taxa de fertilidade semelhante à alcançada por cobrição natural, com aproximadamente 70 a 80% por ciclo. (Samper *et al.*, 1991; Brinsko & Varner, 1992; Alghamdi *et al.*, 2004).

Sémen Refrigerado

Há diversos relatórios na literatura que nos dão taxas de gestação para sémen refrigerado entre 31 a 96 %. Em termos práticos, considera-se que quando trabalhamos com sémen refrigerado com motilidade superior a 30%, devemos alcançar taxas de gestação por ciclo superiores a 50% (Brinsko *et al.*, 2000; Metcalf, 2002; Bedford-Guaus, 2007), alcançando uma fertilidade por época reprodutiva na ordem dos 80-90% (Samper *et al.*, 1991; Brinsko & Varner, 1992; Brinsko *et al.*, 2000; Loomis, 2001b; Metcalf, 2002; Alghamdi *et al.*, 2004; Bedford-Guaus, 2007; Samper, 2009).

Sémen Congelado

Quando utilizamos sémen congelado, este deve ser sempre avaliado microscopicamente (avaliar a motilidade dos espermatozóides), após descongelação, para verificar a sua viabilidade. No entanto, há casos em que sémen após a descongelação tem excelentes características (elevada % de PMS) mas que não consegue estabelecer uma gestação. Assim, a capacidade de fertilização do sémen congelado deve ser verificada antes da sua comercialização, utilizando para o efeito uma égua de proprietário, p.ex., a menos que os proprietários das éguas estejam cientes que o sémen não foi ainda testado ou que não resultou ainda em nenhuma gestação. A utilização de sémen congelado permite no entanto a utilização de menores volumes de sémen (1-5 ml), com elevadas concentrações de espermatozóides (Loomis, 2001a; Bedford-Guaus, 2007; Samper, 2009).

As taxas de gestação por ciclo rondam em média os 40%. Estes valores são no entanto muito variáveis dependendo do manuseamento do sémen e do garanhão, pelo que não é incomum as taxas de gestação por ciclo variarem entre os 0 e os 70% (Samper *et al.*, 1991; Loomis, 2001a,b; Loomis & Squires, 2005; Bedford-Guaus, 2007; Samper, 2009). Pensa-se que apenas 25% dos garanhões utilizados para congelação de sémen consigam taxas de gestação comparáveis com as obtidas através da utilização de sémen fresco ou de cobrição natural, alcançando os restantes 75% taxas de gestação por ciclo inferiores às obtidas com sémen fresco ou cobrição natural. No entanto, a taxa de gestação no final da época reprodutiva, para alguns destes garanhões, pode rondar os 80% (Barbaciani, 2009; Samper, 2009).

Assim, as taxas de gestação com sémen refrigerado ou congelado têm sido mais reduzidas que com sémen fresco, havendo contudo uma grande semelhança entre

as taxas obtidas com sémen fresco e com sémen refrigerado (Brinsko & Varner, 1992; Loomis, 2001b; Samper, 2009).

1.8.2 Critérios para definir o momento da IA

Há diversos factores que afectam o “timing” da inseminação, nomeadamente:

- Longevidade do sémen no trato reprodutivo, que depende do tipo de sémen (fresco, refrigerado ou congelado).
- Momento da ovulação
- Técnica de inseminação (Pycock, 2008a; Barbaciani, 2009)

1.8.3 Factores que afectam a eficiência da IA

Existem igualmente vários factores que afectam a IA e a sua eficiência, estando esses factores dependentes tanto da égua, como do garanhão. De forma a conseguir prevenir que haja então uma diminuição de eficiência reprodutiva devemos executar diversos exames:

Garanhão:

- Exame detalhado da capacidade reprodutora do garanhão (ganhões com baixo líbido ou dificuldades em cobrir podem diminuir a eficiência da IA)
- Confirmação da qualidade do sémen do garanhão (sémen de má qualidade pode ter menor longevidade no trato reprodutivo ou pode não poder ser refrigerado ou congelado)
- Adequada manipulação e armazenamento do sémen após colheita (manuseamento inadequado pode prejudicar a qualidade do sémen e a sua longevidade, prejudicando assim a eficiência da IA; Loomis & Squires, 2005; Pycock, 2008a; Samper, 2009)

Égua:

- Exame reprodutor meticoloso e sistemático (a detecção de patologias reprodutivas irá afectar negativamente a eficiência da IA)
- Indução de um estro ovulatório e previsão do momento da ovulação
- Momento correcto da inseminação relativamente à ovulação (devido à diferente longevidade do sémen no aparelho reprodutor)

- Adequado armazenamento e manuseamento do sémen
- Técnica de inseminação correcta
- Exames e tratamentos pós-inseminação (se necessário)
- Correcto diagnóstico de gestação 14 a 16 dias após a inseminação (Pycock, 2008a; Samper, 2009)

OBJECTIVOS

O Puro Sangue Lusitano (PSL) é a principal raça autóctone de equinos Portuguesa, mas não existem estudos relativamente às características seminais ou à possibilidade de conservar sémen para utilização futura (Gamboa *et al.*, 2009).

Neste contexto, este trabalho pretende fazer um estudo sobre o panorama da reprodução equina na região da Grande Lisboa / Ribatejo, tendo como objectivo avaliar o efeito da idade da égua e do tipo de cobrição (natural e inseminação artificial) na taxa de fertilidade de éguas Puro Sangue Lusitanas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Casuística das actividades desenvolvidas

Durante estes meses de trabalho foram inúmeras as competências adquiridas e múltiplas as actividades desenvolvidas. Destas actividades, aquela que teve maior foco foi a do manejo reprodutivo de equinos, pois acompanhou-se a época reprodutiva, a partir de Março (até essa altura havia pouca incidência de éguas ou garanhões que os proprietários desejassem reproduzir - Ver tabela 8).

Tabela 8 - Frequência Absoluta e Relativa das intervenções realizadas durante o estágio

	FA	FR
Controlo reprodutivo (CR)	540	91,21%
Patologia Clínica	12	2,03%
Profilaxia	13	2,2%
Identificação animal	27	4,56%
Total	592	100%

A grande maioria das intervenções realizadas foi na área do manejo reprodutivo, área esta que tem vindo a crescer bastante na espécie equina nos últimos anos.

O elevado número de intervenções é facilmente explicável pelo facto de nos encontrarmos em plena época reprodutiva, e pelo rigoroso controlo que é necessário para se conseguir efectuar um bom manejo reprodutivo.

Dentro do manejo reprodutivo salientamos:

- Exame reprodutivo da égua (observação da genitália, palpações rectais, exploração ecográfica, etc.);
- Identificação e tratamento de patologias do aparelho reprodutor da égua e garanhão, com particular ênfase nas doenças infecciosas. Nos garanhões em que se pretende realizar colheita de sémen são feitos exames bacteriológicos (Metrite Contagiosa, p.ex.) e virológicos (Artrite Viral Equina e Anemia Infecciosa);
- Colheita de sémen a garanhões com recurso a uma vagina artificial utilizando uma égua residente ou manequim em estação;
- Processamento do sémen para congelação, refrigeração, ou utilização em fresco;
- Utilização da ultra-sonografia e interpretação das ecografias transrectais na égua. Este foi o procedimento mais efectuado ao longo do estágio, sendo que a maior parte das ecografias serviu para avaliar o desenvolvimento folicular e prever a data da ovulação e, conseqüentemente, da inseminação, outras ecografias serviram para realizar diagnóstico de gestação por volta dos 14 e dos 30 dias de gestação;
- Tratamentos hormonais e lavagens uterinas. Realizaram-se lavagens uterinas com Lactato Ringer e administração intra-uterina de antibióticos. Foi possível diagnosticar quistos uterinos através de avaliação ecográfica nalgumas éguas. A administração de PGF2 α (Dinolytic® - Pfizer) para indução do cio, e hCG (Gonadotrofina Coriónica Humana) (Pregnyl® - MSD) para indução da ovulação foram os tratamentos hormonais mais realizados.
- Acompanhamento do processo de inseminação artificial na égua. O controlo do cio e a indução da ovulação teve como principal objectivo poder realizar inseminação, mas também foi utilizado, mais raramente, para monta natural.

Na figura 4 pode-se ver alguns dos diferentes instrumentos utilizados para recolha e armazenamento de sêmen existentes na Luso-Pecus.

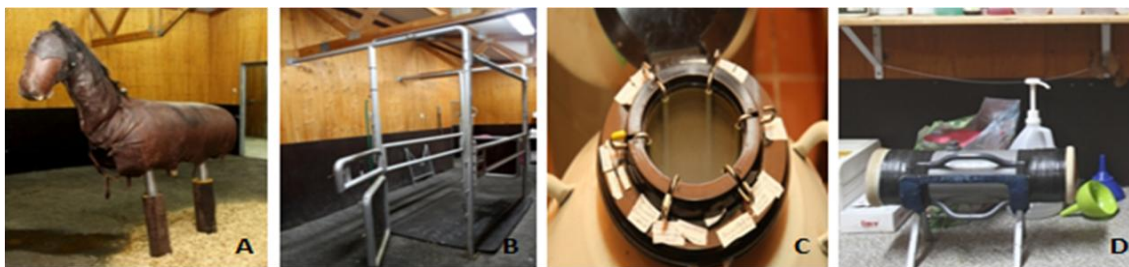


Figura 4– Diferentes instrumentos para recolha e armazenamento de sêmen na Luso-Pecus. A – Manequim para recolha de sêmen; B – Tronco de contenção e exame; C – Contentor para armazenar sêmen congelado em azoto líquido; D – Vagina artificial modelo Missouri

A nível de controlo reprodutivo foram realizados diversos tipos de intervenções, tanto em éguas como em garanhões, mas maioritariamente nas primeiras, como se pode ver nos gráficos 1 e 2:

Gráfico 1 - Frequência absoluta do controlo reprodutivo de éguas e garanhões

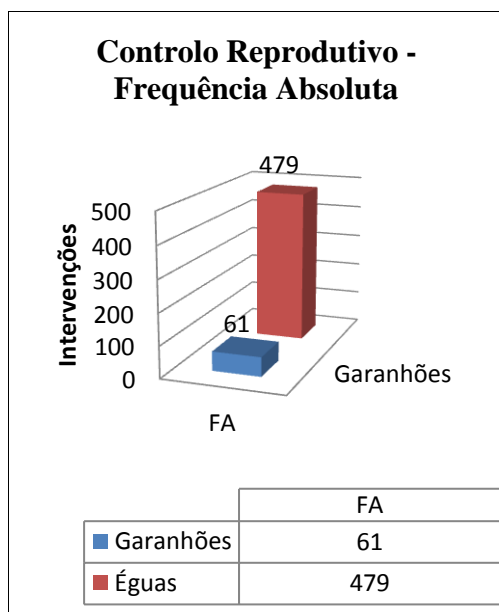
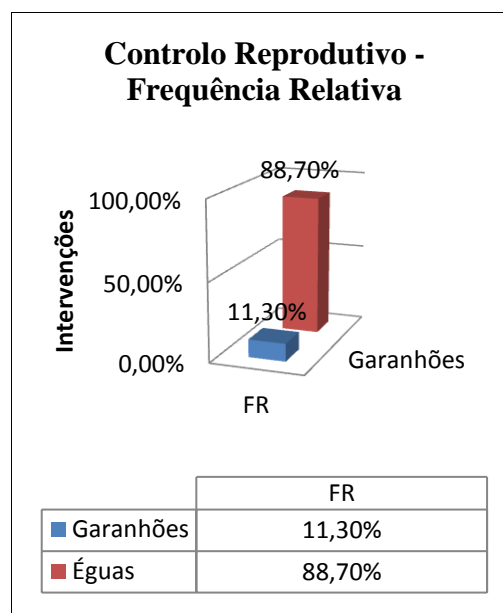


Gráfico 2 - Frequência relativa do controlo reprodutivo de éguas e garanhões



Contudo, os exames ginecológicos das éguas foram as intervenções com maior expressão quantitativa. Nestes exames incluíram-se palpções transrectais, exames de ultrassonografia, administrações de fármacos e tratamentos intra-uterinos. (ver tabela 9)

Na tabela abaixo estão descritos os vários campos de intervenção nesta área, bem como as FR e FA:

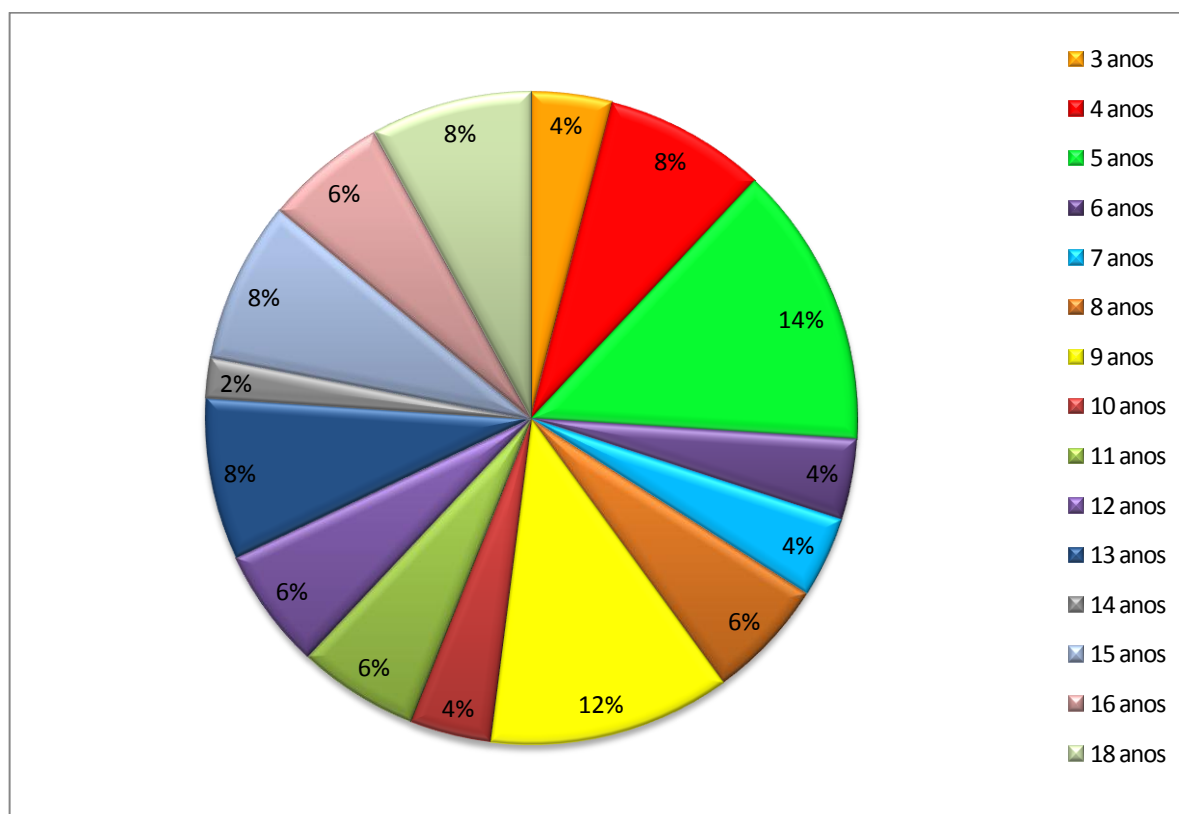
Tabela 9 - Frequência absoluta e frequência relativa dos diferentes tipos de intervenções no Controlo Reprodutivo

Actividade realizada	FA (n)	FR (%)
Exame reprodutivo	307	56,85%
Diagnóstico de gestação	105	19,44%
Colheita de Sêmen	61	11,30%
Inseminação Artificial	67	12,41%
Total	540	100%

Podemos por estes números apercebermo-nos da relevância do exame reprodutivo, comparativamente com as restantes actividades de controlo reprodutivo.

Neste estudo tomaremos apenas em consideração as éguas PSL, constituindo assim uma amostra de 50 éguas, com idades compreendidas entre os 3 e os 18 anos (apêndice 1, gráfico 3), com uma média de 9,92 anos (apêndice 2).

Gráfico 3 - Idade das diferentes éguas utilizadas



Para fazer a análise estatística dos resultados utilizou-se o programa de computador SPSS, e executaram-se os seguintes testes:

- Teste exacto de Fisher;
- Teste de Qui-quadrado;
- Testes de Shapiro-Wilk para a normalidade;
- Teste de ANOVA;
- Teste de Kruskal-Wallis;
- Testes não paramétricos;
- Comparações múltiplas (POST-Hoc de Tukey)

2.2 Metodologia das inseminações

Por forma a conseguir garantir os melhores resultados possíveis, foi sempre feito um acompanhamento das éguas, através de um exame transrectal sistemático, que incluía a palpação dos ovários, que durante o estro podem medir 3 a 8 cm (Ricketts, 2008a), e detecção de folículos. À medida que o estro progride os folículos maturam e crescem para dimensões superiores a 30 mm de diâmetro, tornando-se mais suaves à palpação e mais deformáveis e menos circulares à ecografia, quando se aplica uma ligeira pressão com a sonda (Ricketts, 2008a).

A presença dos folículos e as suas dimensões foram confirmados por exame ecográfico, como uma estrutura anecogénica, circular e capsulada, num estroma ovárico hiperecogénico (Blanchard *et al.*, 2003; Pineda & Dooley, 2003; Ricketts, 2008a; Samper 2009). Nesse mesmo exame procedeu-se à medição dos folículos, repetindo-se diariamente os exames quando os folículos se apresentavam maiores que 33 mm. Quando os folículos se encontravam com menos de 30 mm de diâmetro, considerou-se um crescimento de 3 mm por dia, e voltou-se a fazer uma avaliação imagiológica quando se estimava que os folículos estariam perto dos 30 mm de diâmetro.

Quando o tamanho dos folículos foi superior a 37 mm procedeu-se à administração de 2500 ou 3000UI de hCG (Pregnyl® - MS&D). A hCG é um produto eficaz com um preço moderado. É utilizada para induzir a ovulação em éguas cíclicas que demonstram sinais de estro com um folículo igual ou superior a 35mm de diâmetro (Rizzo *et al.*, 2009; Samper, 2009).

A administração de hCG foi feita por via endovenosa (EV), fazendo com que, normalmente, se desse a ovulação num espaço de 24 a 48 horas (Taylor-MacAllister &

Freeman, 2007; Davies Morel & Newcombe, 2008; Rizzo *et al.*, 2009; Samper, 2009). Fez-se a administração do hCG quando os folículos alcançaram esta dimensão pois considerou-se que folículos com dimensões entre 40 a 50 mm são pré-ovulatórios (Blanchard *et al.*, 2003; Pineda & Dooley, 2003; Samper 2009).

Apesar de existir uma grande utilização de hCG para promover a ovulação em reprodução equina, existe pouca informação sobre as doses que devem ser utilizadas e sobre as suas contra-indicações (Davies Morel & Newcombe, 2008).

A forma dos folículos ficou mais triangular entre 24 a 48 horas antes da ovulação, com o ápex na direcção da fossa ovulatória do ovário e com uma parede aparentemente mais espessa (Blanchard *et al.*, 2003; Ricketts, 2008a). Posteriormente à administração de hCG observou-se novamente a égua passadas 12 a 24 horas, uma vez que, como já foi referido, a administração de hCG iria induzir a ovulação desse folículo em 24 a 48 horas (Taylor-MacAllister & Freeman, 2007; Samper, 2009).

2.2.1 Recolha de Sémen

Para efectuar a recolha de sémen levou-se o garanhão ao manequim, após preparação prévia da vagina artificial. Caso o garanhão não demonstrasse interesse pelo manequim, colocava-se uma égua dentro da sala para estimular a libido do garanhão.

Após a recolha, retirou-se o plasma seminal (mistura de secreções produzidas nos testículos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias), e o sémen foi avaliado para se saber o seu volume, concentração, motilidade, existência de sujidade, presença de formas anormais e de espermatozóides mortos, sendo estes últimos quatro parâmetros avaliados através de observação ao microscópio, numa lâmina aquecida a 37°, visto ser a temperatura ideal para a actividade dos espermatozóides (Petrunkina *et al.*, 2007; Kareskoski & Katila, 2008; Pycock, 2008a; Heise *et al.*, 2010). Estes parâmetros vão determinar a quantidade de doses que um ejaculado pode proporcionar, com base na fórmula:

$$\text{número de doses} = \frac{\text{volume do ejaculado} \times \text{concentração do ejaculado}}{\text{quantidade de espermatozóides por dose}}$$

A quantidade de espermatozóides por dose varia consoante o tipo de sémen que se pretende, podendo ser de 300 a 500 milhões (sémen fresco e refrigerado) até 800 milhões (sémen congelado) (Blanchard *et al.*, 2003).

Caso o sémen não fosse recolhido no centro, mas enviado de fora, fazia-se a avaliação microscópica para ter uma noção da qualidade do sémen com que se iria inseminar as éguas.

Sendo a recolha de sémen efectuada na Lusopecus, preparou-se o sémen consoante a utilização que ia ter, sendo que para sémen fresco fez-se uma diluição de 1:2 ou de 1:3 utilizando como diluidor, INRA96®, e no caso de ser para refrigerar sémen fez-se uma diluição de 1:3 com INRA96® e seguidamente recolheu-se uma dose em seringas de 25 ml e colocou-se 2 seringas numa caixa isoladora térmica, com 2 placas acumuladoras de frio.

A inseminação foi feita com a égua num tronco de contenção (figura 4B, página 54), começando por dar um nó na cauda da égua, após o que se procedeu a uma palpação e esvaziamento do recto da égua e, seguidamente, à limpeza da vulva e região perineal, com uma solução de clorhexidina ou com sabão azul e branco. A desinfecção repetida da genitália externa das éguas deve ser evitada devido ao risco de perturbar a flora bacteriana comensal, incentivando assim a colonização por potenciais patogéneos venéreos *Klebsiella* spp. ou *Pseudomonas* spp (Ricketts, 2008a).

Nesta altura, caso se estivesse a utilizar sémen refrigerado, o recipiente era aberto, as doses retiradas e seguradas pelo estagiário para as aquecer ligeiramente enquanto continuavam protegidas da luz. A Médica Veterinária colocava então luvas estéreis, pegava numa pipeta estéril e punha lubrificante estéril não espermicida na mão que ia ficar a segurar numa das extremidades da pipeta, inserindo uma das seringas na outra extremidade, pressionava o êmbolo até a pipeta estar preenchida com sémen. Seguidamente inseria a pipeta de inseminação com lubrificante não espermicida na vulva da égua, guiando-a até passar o cérvix, apesar da passagem da pipeta pelo cérvix nem sempre ser fácil (Pycock, 2008a).

É muito importante que a pipeta alcance o meio do corpo uterino não ficando obstruída no cérvix. Seguidamente injectou-se o sémen no útero, fazendo-se uma correcção na posição da pipeta caso se sentisse resistência. Para terminar retirou-se a seringa, encheu-se com um volume de ar correspondente ao volume da pipeta e voltou-se a ligar a seringa à pipeta injetando o ar, por forma a não ficar sémen na pipeta, mas tendo o cuidado de não enviar ar para dentro do útero.

O método de inseminação foi igual tanto para sémen fresco como para sémen refrigerado.

No dia seguinte fez-se novo exame ecográfico e, caso a égua não tivesse ainda ovulado, procedia-se a nova inseminação. Caso já tivesse acontecido a ovulação observava-se

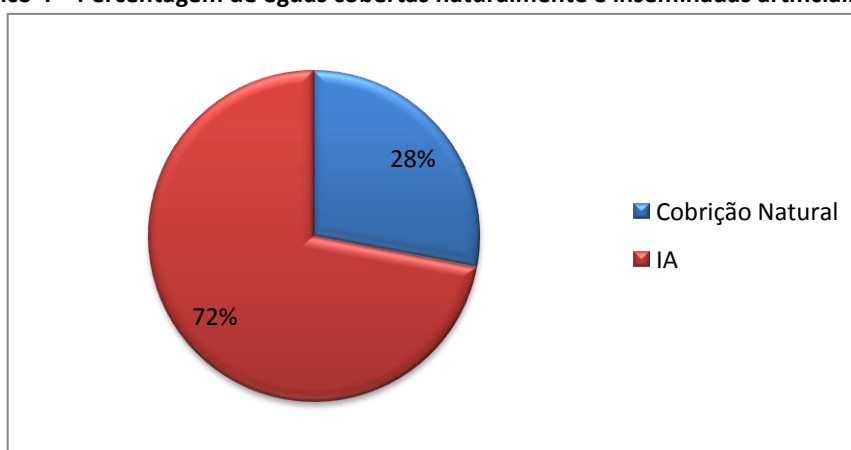
o corpo lúteo, que por vezes pode ser difícil de diferenciar do estroma ovárico (Blanchard *et al.*, 2003; Samper, 2009).

No caso do sémen congelado, passadas doze horas após a administração de hCG começou-se a fazer exame transrectal a cada quatro horas para apanhar o momento da ovulação.

Para além das inseminações, houve alguns casos em que os proprietários optaram por fazer reprodução através de cobrição natural. Nesses casos foi feito o acompanhamento da égua, sendo que quando se fazia a administração de hCG, os proprietários foram aconselhados a executar a cobrição passadas 24 horas após a administração da hormona.

Das 50 éguas utilizadas, 36 foram inseminadas artificialmente e 14 foram cobertas naturalmente (apêndice 3, gráfico 4).

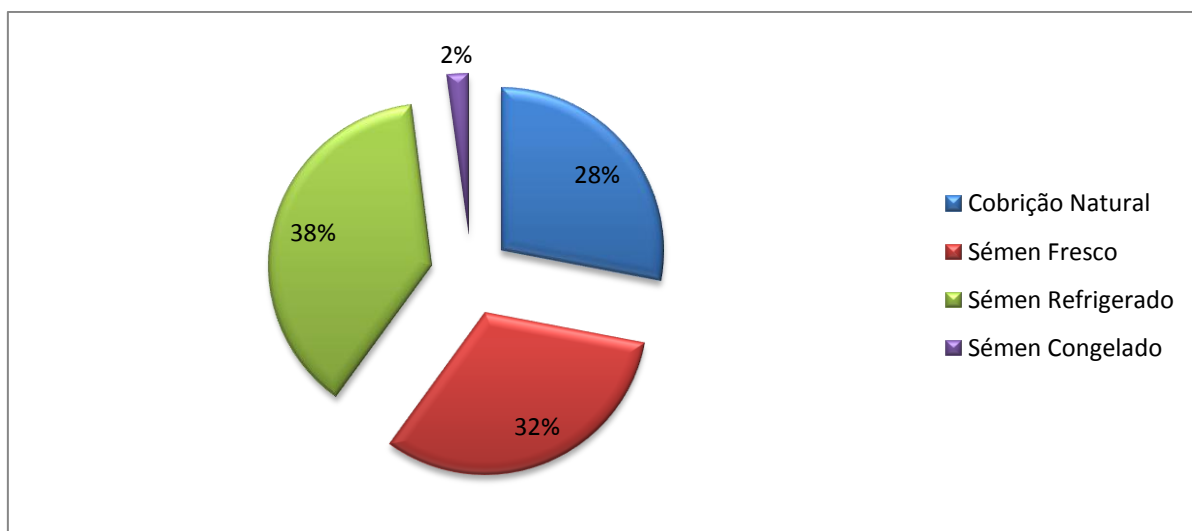
Gráfico 4 – Percentagem de éguas cobertas naturalmente e inseminadas artificialmente



2.3 Resultados

Como já foi referido foram cobertas 14 éguas PSL e inseminadas 36 éguas PSL, 16 com sémen fresco, 19 com sémen refrigerado e apenas 1 com sémen congelado (apêndice 4, gráfico 5).

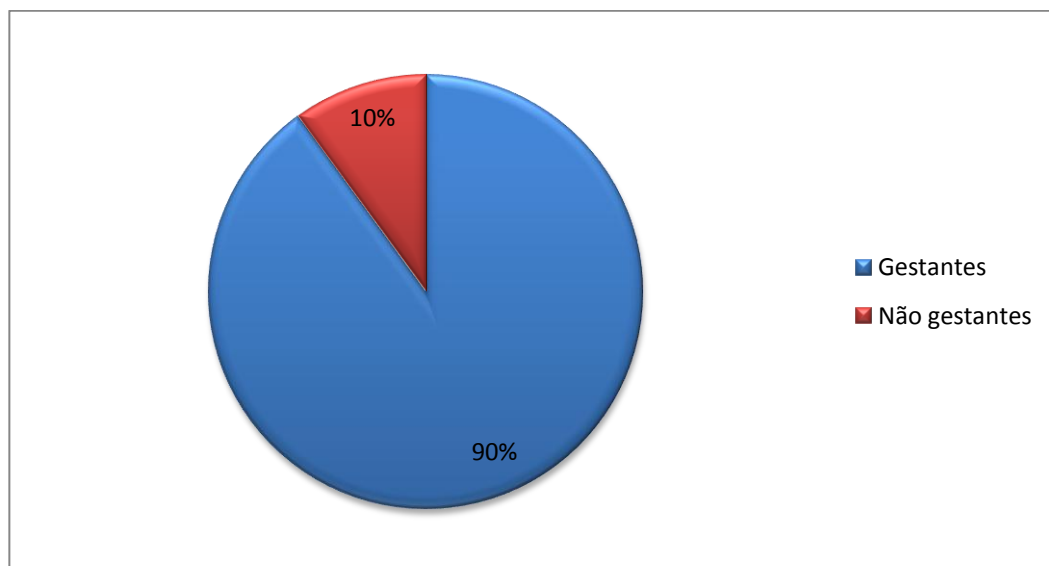
Gráfico 5 - Diferentes tipos de sémen utilizados nas éguas



2.3.1 Éguas

Das 50 éguas utilizadas no estudo, 45 (90%) ficaram gestantes e apenas 5 (10%) não gestantes (gráfico 6, apêndice 5).

Gráfico 6 - Quantidade de éguas gestantes e não gestantes



A idade média das éguas que não ficaram gestantes foi de 9,00 anos, e a das éguas que ficaram gestantes foi de 10,02 anos (apêndice 6).

A idade média das éguas utilizadas para cobrição natural foi inferior à das éguas utilizadas para IA (apêndice 7).

Das 50 éguas utilizadas, 37 apenas necessitaram de um ciclo, 9 necessitaram de 2 ciclos e apenas 4 necessitaram de 3 ciclos para se chegar ao diagnóstico de gestação final (quer devido a ficarem gestantes, ou devido aos proprietários não quererem fazer mais tentativas para que ficassem; apêndice 8, gráfico 7). Do total da amostra, 31 das éguas necessitaram apenas de uma tentativa (IA ou cobrição) para se obter um diagnóstico de gestação final, 11 precisaram de 2, 6 éguas precisaram de 3, e apenas 1 égua necessitou de 4 tentativas e outra de 7 (apêndice 9, gráfico 8). O número mais elevado de tentativas por vezes deveu-se ao facto de o sémen ser de má qualidade e se optar por mais de 1 inseminação, ou por o garanhão ter dado uma dose elevada de sémen pelo que se podia inseminar a égua no final de um dia e novamente no início do dia seguinte.

Gráfico 7 - Quantidade de ciclos necessários por égua

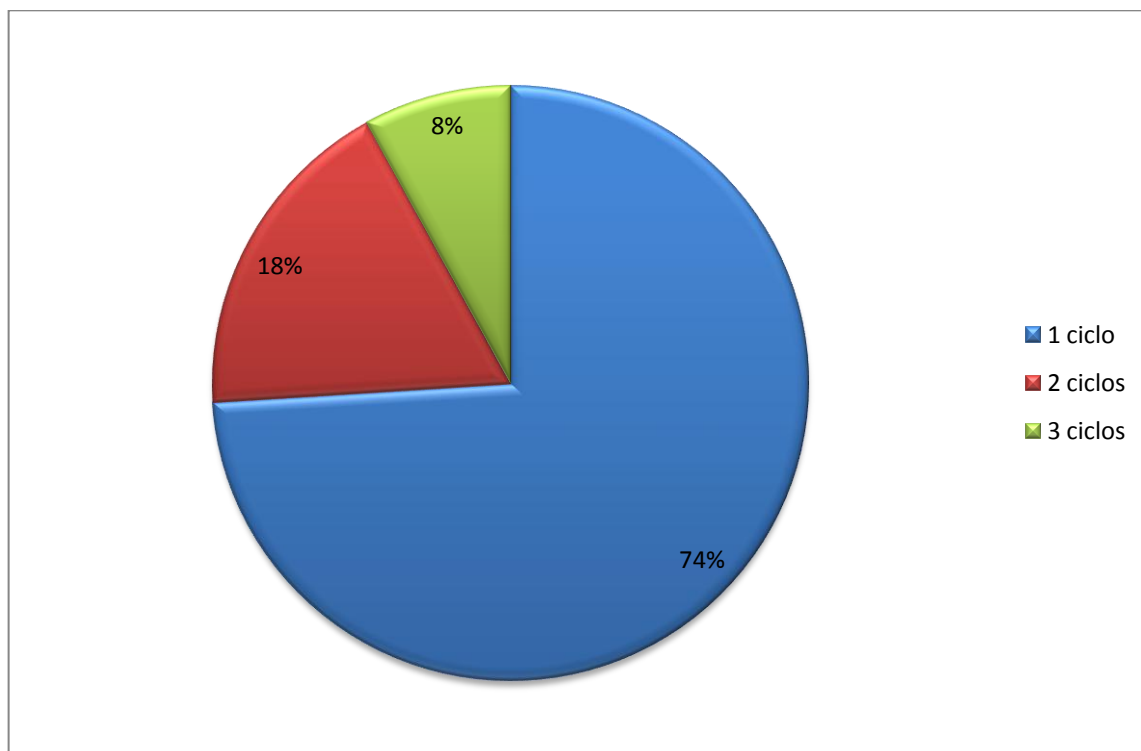
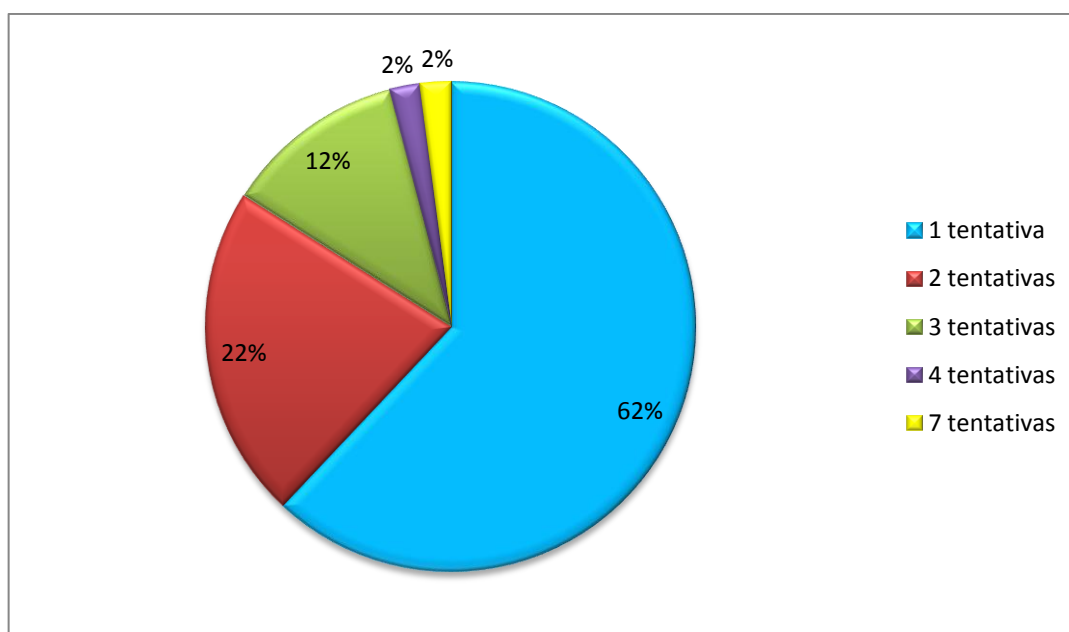


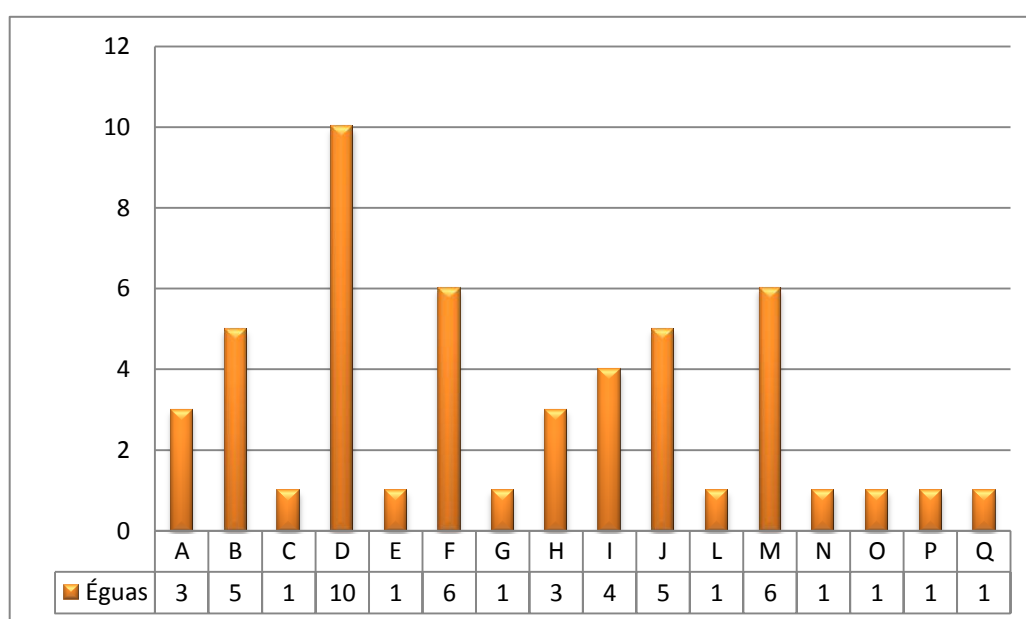
Gráfico 8 - Quantidade de tentativas por égua



2.3.2 Garanhões

Relativamente aos garanhões, foi utilizado sêmen de 16 garanhões diferentes, aqui identificados por letras, podendo verificar-se que o garanhão D foi o mais utilizado, servindo para 10 éguas, e que 8 dos garanhões foram utilizados para apenas 1 égua (apêndice 10, gráfico 9).

Gráfico 9 - Quantidade de éguas inseminadas/cobertas por garanhão



Os garanhões utilizados para cobrição natural foram 10, sendo que apenas os garanhões C, G e P deixaram um total de 3 éguas não gestantes, tendo os restantes garanhões feito com que todas as éguas (11) ficassem gestantes (gráfico 10).

Já relativamente a IA, apenas os garanhões D e H não fizeram 1 égua ficar gestantes cada um deles, tendo contudo o garanhão D sido utilizado para um total de 9 éguas por IA (gráfico 11).

Gráfico 10 - Éguas gestantes e não gestantes por garanhão por cobrição natural

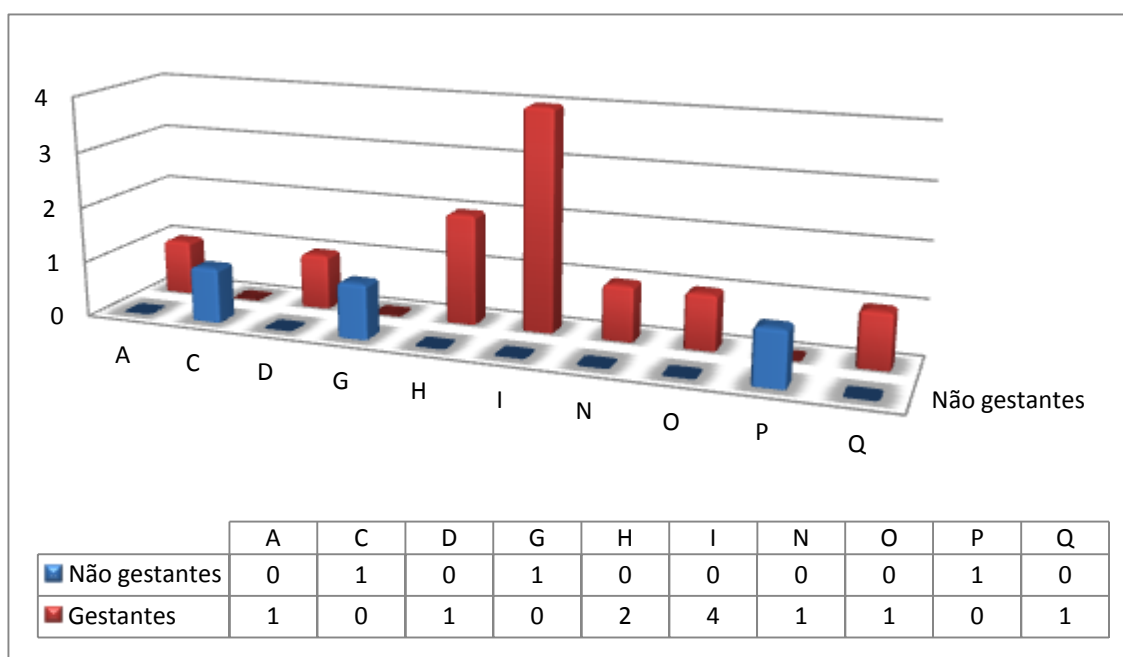
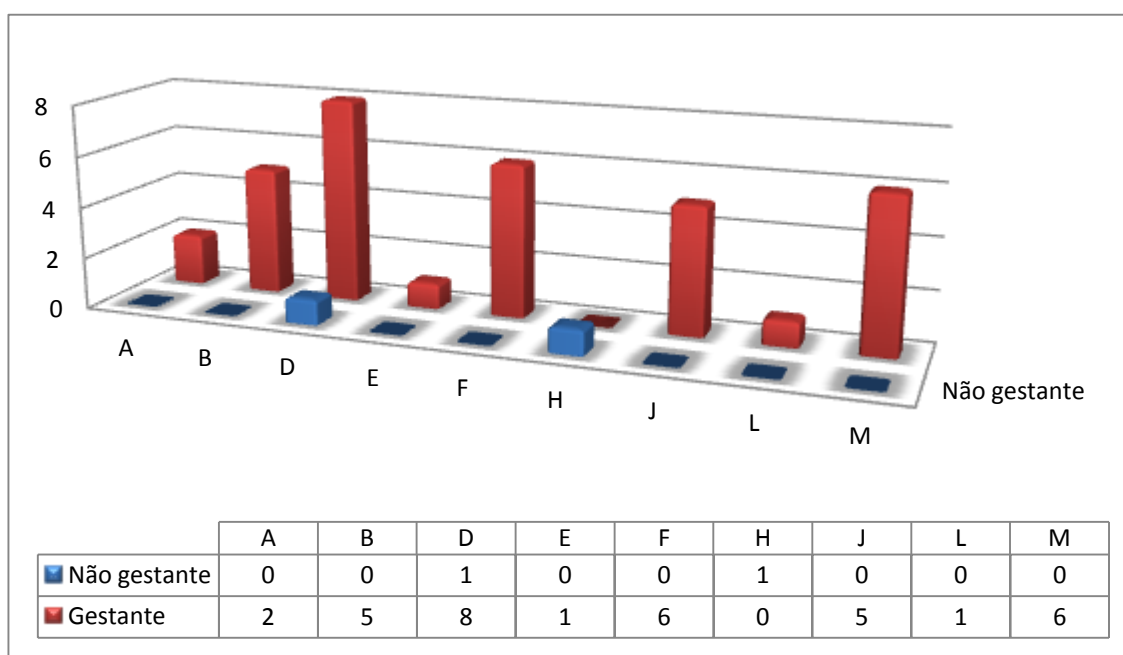


Gráfico 11 - Éguas gestantes e não gestantes por garanhão através de IA



2.3.3 Taxas de fertilidade

Para os proprietários o aspecto mais importante é a percentagem de éguas que ficam gestantes (Ley, 2004), sendo este o principal ponto levado em consideração, sem dar relevância à quantidade de inseminações e/ou de ciclos éstricos necessários até à égua ficar gestante. Estima-se que a taxa de fertilidade em éguas se situe entre os 71% e os 96% (Ball, 1988).

A taxa de fertilidade é-nos dada dividindo o número de éguas que ficaram gestantes pela quantidade total de éguas cobertas ou inseminadas, multiplicando depois por 100.

$$Taxa\ de\ fertilidade = \frac{\text{Número de éguas gestantes}}{\text{Número total de éguas}} \times 100$$

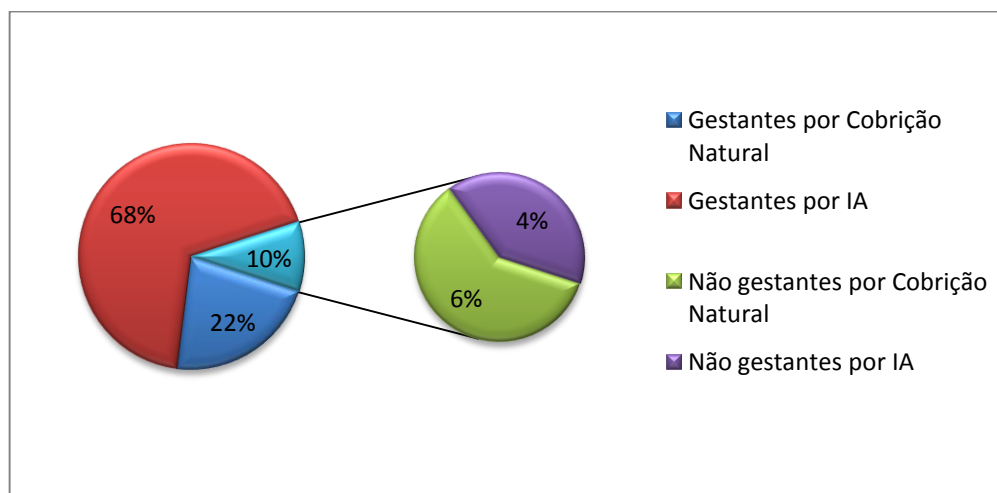
Esta mesma fórmula pode ser utilizada para calcular a taxa de fertilidade por IA e por cobrição natural.

2.3.3.1 Influência do tipo de sémen na taxa de fertilidade

Das 50 éguas utilizadas, 45 ficaram gestantes, pelo que a taxa de fertilidade da época reprodutiva foi de 90%, a taxa de fertilidade para a cobrição natural foi de 78,6% e para a IA foi de 94,4% (apêndice 11).

Dos 90% de éguas que ficaram gestantes, 68% correspondem a IA e 22% a cobrição natural, e dos 10% de éguas que não ficaram gestantes, 4% correspondem a IA e os restantes 6% a cobrição natural (gráfico 12).

Gráfico 12 - Éguas gestantes e não gestantes por IA e por cobrição natural



O teste exacto de Fisher ($p=0,093$, fisher= 0,113; apêndice 12) sugere que não existe associação estatisticamente significativa entre o diagnóstico de gestação e o método utilizado (IA, cobrição natural).

Dentro da IA, as taxas de fertilidade para os diferentes tipos de sémen foram de 93,8% para sémen fresco, 94,7% para sémen refrigerado e de 100% para sémen congelado (apêndice 13).

Não se pode efectuar estatística inferencial, nomeadamente o teste de Qui-quadrado por não se terem verificado contagens esperadas superiores a 5 em 66,7% das células.

2.3.3.2 Influência da idade na taxa de fertilidade

Relativamente à influência da idade nos diagnósticos de gestação, o teste de Shapiro-Wilk para a normalidade falhou (apêndices 14 e 15), pelo que é necessário a utilização de testes não paramétricos. Através destes é possível verificar que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com diagnóstico positivo e negativo, no que diz respeito à idade ($p=0,660$; apêndice 16).

De acordo com a estatística descritiva, onde se verificou que os animais sujeitos a cobrição natural eram mais novos e os sujeitos a IA mais velhos, existem diferenças estatisticamente significativas entre as idades das éguas cobertas e inseminadas ($p=0,003$; apêndice 17).

As éguas que apenas precisaram de um ciclo para se obter um diagnóstico de gestação final tinham uma média de idade de 10,22 anos, as que necessitaram de 2 ciclos tinham uma média de idades de 7,89 anos, e as que precisaram de 3 ciclos tinham uma média de idade de 11,75 anos (apêndice 18).

Os animais sujeitos a um ciclo não tem uma distribuição normal da variável idade ($p=0,038$; apêndice 19). Preconiza-se a aplicação do teste alternativo à ANOVA (paramétrico): o teste de Kruskal-Wallis (apêndice 20). Este teste sugere que não existem diferenças das idades nos três grupos de ciclos (apenas 1 ciclos, 2 ciclos e 3 ciclos; $p=0,329$).

Em relação ao número de tentativas todos os grupos possuem uma distribuição normal (apêndice 21), pelo que foi efectuado o teste de ANOVA (apêndice 22). Este sugere que não existem diferenças significativas entre as médias de idades ($p=0,174$).

Adicionalmente efecturam-se as comparações múltiplas (POST-Hoc de Tukey; apêndice 23), para verificar se haveria alguma tendência nas diferenças mesmo não havendo diferenças pelo teste de ANOVA (acima referido), não se tendo encontrado tendências.

3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os proprietários pretendem ter um poldro a cada ano por égua. Contudo na maioria das coudelarias acontecem falhas na concepção e gestação que resultam em que algumas éguas não fiquem gestantes.

Por forma a maximizar a fertilidade e, conseqüentemente, a eficiência reprodutiva, tornou-se uma política de rotina internacional os Médicos Veterinários fornecerem exame ginecológico de rotina às coudelarias, sendo que uma abordagem lógica e consistente é essencial para otimizar resultados (Ricketts, 2008a,b).

O Médico Veterinário deve conhecer cada égua individualmente, respectivamente o seu comportamento cíclico, função ovárica e competência uterina, enquanto procura quaisquer patologias. Os mesmos princípios aplicam-se aos programas que utilizam cobrição natural e aos que utilizam IA (Ricketts, 2008a,b).

A vantagem da utilização de exames de ultra-sonografia dos ovários da égua durante o período periovulatório é que nos permite determinar o número, localização, tamanho e forma dos folículos e, por oposição à palpação, permite também detectar ovulações múltiplas de folículos adjacentes num mesmo ovário (Blanchard *et al.*, 2003).

Historicamente é sugerido que a espécie equina alcança taxas de fertilidade relativamente reduzidas, e que pioram com a domesticação (Ricketts, 2008b).

Há duas grandes razões para a fertilidade na população equina ser reduzida quando comparada com outras espécies. A primeira reside no facto da eficiência reprodutiva não ser um critério utilizado para determinar os animais de reprodução, a outra é que, desde que o dia 1 de Janeiro foi declarado, no século XIX, a data oficial de nascimento dos poldros, muitos proprietários começaram a tentar reproduzir no inverno e no início da primavera, fora do período mais fértil, para que os poldros nascessem o mais perto possível de dia 1 de Janeiro (Samper, 2009).

O objectivo de qualquer Médico Veterinário e proprietário em reprodução de equinos deve ser produzir o máximo número de poldros vivos e saudáveis possíveis das éguas reproduzidas durante a época reprodutiva (Ricketts, 2008b).

Neste estudo verificou-se que a percentagem de éguas gestantes no final da época reprodutiva foi de 90%, encontrando-se assim dentro dos valores esperados, uma vez que a taxa de fertilidade em éguas é esperada que se situe entre os 71% e os 96% (Ball, 1988).

Respectivamente aos diferentes tipos de cobrição, verificou-se que a taxa de fertilidade em éguas cobertas por cobrição natural era de 78,6% e por IA era de 94,4%.

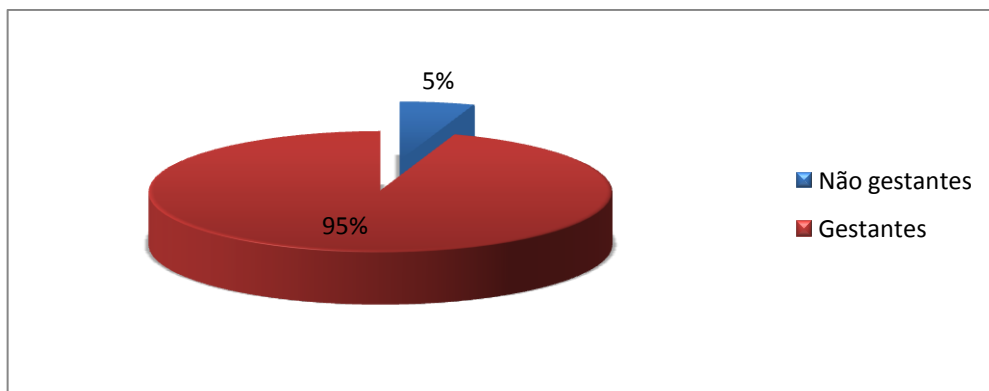
Dentro da IA, a taxa de fertilidade com sémen fresco foi de 93,8%, com sémen refrigerado foi de 94,7% e com sémen congelado foi de 100%. Os valores para sémen fresco e refrigerado encontram-se dentro do esperado (Samper et al., 1991; Brinsko & Varner, 1992; Brinsko *et al.*, 2000; Loomis, 2001b; Metcalf, 2002; Alghamdi et al., 2004; Bedford-Guaus, 2007; Samper, 2009), sendo que o para sémen congelado não podemos elaborar quaisquer discussões visto apenas ter sido efectuada 1 inseminação, pelo que o resultado não pode ser avaliado.

Ao longo deste estudo acompanhámos diversas éguas, sendo que algumas delas eram mais nervosas e não gostavam de estar na manga, tendo elevados níveis de stress, o que pode afectar a fertilidade. Algumas éguas eram mais velhas e dóceis, mas devido à idade também podiam ter fertilidade reduzida, apesar de isto não se ter verificado neste estudo, o que se deverá à dimensão reduzida da amostra. Para além disto, o maneio que os proprietários davam às éguas pré e pós-inseminações também pode afectar a fertilidade das éguas.

Neste estudo, visto ter-se acompanhado a época reprodutiva mas não tendo tido hipótese de confirmar a taxa de poldros vivos na época seguinte, esse ponto não pode ser tomado em consideração.

Com base então apenas neste parâmetro, e como já foi referido anteriormente, pudemos verificar que obtivemos uma percentagem de éguas gestantes na ordem dos 94,4% através de IA (sémen fresco, sémen refrigerado e sémen congelado), resultado este que se situa dentro dos valores esperados (gráfico 13).

Gráfico 13 - Percentagem de éguas gestantes e não gestantes através de IA



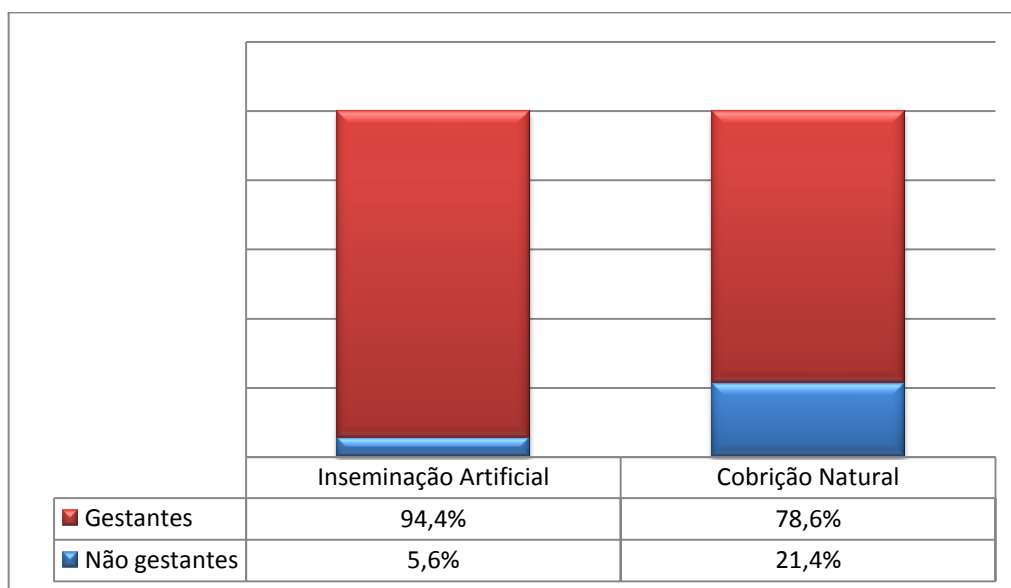
Este resultado revela uma eficiência reprodutiva superior à encontrada na raça Morgan, p.ex., onde a taxa de gestações observada foi de 71% (Leite *et al.*, 2011).

Os Puro Sangue Inglês (PSI) apresentam uma eficiência reprodutiva no primeiro ciclo de cerca de 43%, subindo para 77% quando se avaliam 5 ciclos (Sullivan *et al.*, 1975), devendo esperar taxas de fertilidade na ordem dos 85-90%, em populações de PSI com fertilidade normal e bom manejo (Morris & Allen, 2002; Ricketts, 2008b). Os Quarter-Horse apresentam uma eficiência reprodutiva de 51% no primeiro ciclo, subindo para 85% ao longo de cinco ciclos (Sullivan *et al.*, 1975), pelo que este estudo revela uma eficiência reprodutiva no Puro-Sangue Lusitano ligeiramente acima destes valores.

Neste estudo podemos ainda verificar que através de cobrição natural a taxa de fertilidade diminui para 78,6%.

A eficiência reprodutiva utilizando cobrição natural foi assim inferior à que se obteve utilizando inseminação artificial (gráfico 14).

Gráfico 14 - Percentagem de éguas gestantes e não gestantes através de Inseminação Artificial e de Cobrição Natural



Verificou-se que algumas das éguas apenas necessitaram de um ciclo para ficarem gestantes, enquanto que outras necessitaram de mais ciclos, isto pode então dever-se ao próprio carácter da égua (éguas mais dóceis, menos nervosas, com menos tendência a ficarem stressadas, têm mais facilidade em ficar gestantes), à idade (éguas mais velhas podem ter mais dificuldades) ou ao próprio manejo a que eram submetidas (condições menos stressantes, mais horas de luz diárias podem ajudar a que a égua fique gestante).

Assim não encontrámos diferenças na maneira como o tipo de cobrição (cobrição natural vs. IA) afecta a taxa de fertilidade, o que vai de encontro à bibliografia (Samper et al., 1991; Brinsko & Varner, 1992; Brinsko *et al.*, 2000; Loomis, 2001b; Metcalf, 2002; Alghamdi et al., 2004; Bedford-Guaus, 2007; Samper, 2009), e a idade não parecer ser um factor relevante neste estudo, contrariamente ao que é referido na bibliografia que mostra que a idade influencia a taxa de fertilidade e que a partir dos 14 anos de idade a taxa de fertilidade de uma égua entra em declínio (Ball, 2000; Ricketts, 2008b; Samper, 2009; Katila *et al.*, 2010), o que se deverá provavelmente à reduzida dimensão da amostra.

Outro factor que afecta a taxa de fertilidade é então o próprio garanhão, e a qualidade do seu sémen. Assim, garanhões com mau sémen, com sémen com menos motilidade ou com um maneio mais stressante apresentaram uma menor taxa de fertilidade. Para além destes, que são factores intrínsecos ao garanhão ou ao sémen, temos também factores extrínsecos como a necessidade de refrigeração ou congelação, a utilização de diferentes diluidores quando se preparava o sémen para estes métodos, a distância que o sémen tinha que percorrer e, consequentemente, o tempo que ficava refrigerado, tudo isto são factores que afectam o resultado final da IA (Sieme *et al.*; 2004).

Concluimos assim que a taxa de fertilidade em éguas cobertas por cobrição natural e por IA se situa dentro dos valores esperados, bem como os resultados obtidos dentro da IA através da utilização de sémen fresco e de sémen refrigerado (não sendo possível aferir qualquer conclusão no que diz respeito ao sémen congelado), e que não há relação estatística entre a idade das éguas e a taxa de gestação, contrariamente ao que é referido na bibliografia, o que se deverá provavelmente ao tamanho da amostra (n=50).

Bibliografia

Alghamdi, A. S., Foster, D. N., & Troedsson, M. H. (2004). Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction*, 127, 593-600.

Allen, W. R., & Wilsher, S. (2009). A review of implantation and early placentation in the mare. *Placenta*, 30(12), 1005-1015.

Ball, B. A. (1988). Embryonic loss in mares. Incidence, possible causes and diagnostic considerations. *Vet Clin of North Am Equine Pract*, 4(2), 263-290.

Ball, B. A. (2000). Reduced reproductive efficiency in the aged mare: role of early embryonic loss. *Recent Advances in Equine Theriogenology*. Ithaca: International Veterinary Information Service.

Barbaciani, S. (2009). Frozen Semen Processing and Quality Control. *Proceedings of the 12th International Congress of The World Equine Veterinary Association (WEVA)*. Guarujá, SP, Brasil; WEVA.

Bedford-Guaus, S. J. (2007). Transported Stallion Semen and Breeding Mares with Cooled or Frozen-Thawed Semen. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 6, 239-248.

Bergfelt, D.R., Adams, G.P., & Pierson, R.A. (1998). Pregnancy. *Equine Diagnostic Ultrasonography*. McKinnon, Rantanen ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 125-140.

Betteridge, K. J., Eaglesome, M. D., Mitchell, D., Flood, P.F., & Beriault, R. (1982, Agosto). Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. *J Anat*, 135, 191-209.

Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Brinsko, S. P., & Rigby, S. L. (2003). *Manual of Equine Reproduction* (2^a ed.). Philadelphia: Mosby.

Bolaños, J. M., Morán, Á. M., Silva, C. M., Rodríguez, A. M., Dávila, M. P., Aparicio, I. M., et al. (2012, 26 de Janeiro). Autophagy and apoptosis have a role in the survival or death of stallion spermatozoa during conservation in refrigeration. *Plos One*, 7(1).

Brinsko, S. P., & Varner, D. D. (1992, Abril). Artificial insemination and preservation of semen. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 8(1), 205-218.

Brinsko, S. P., Varner, D. D., & Blanchard, T. L. (2000, 17 de Abril). Transported Equine Semen. *Recent Advances in Equine Reproduction*.

Caixeta, E. S., Fagundes, N. S., Caixeta, M. S., & Pyles, E. S. (2008, Janeiro-Junho). Early equine embryonic development – a review. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 103, 25-34.

Carreau, S., & Hess, R. A. (2010, 27 de Maio). Oestrogens and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365(1546), 1517-1535.

Chemineau, P., Guillaume, D., Migaud, M., Thiery, J. C., Pellicer-Rubio, M. T., & Malpoux, B. (2008, Julho). Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reprod Domest Anim*, 43(s2), 40-47.

Coutinho da Silva, M. (2008). When should a mare go for assisted reproduction? *Theriogenology*, 70(3), 441-444.

Crowell-Davis, S. L. (2007). Sexual behavior of mares. *Horm Behav*, 52(1), 12-17.

Cuervo-Arango, J., Aguilar, J., & Newcombe, J. R. (2009). Effect of type of semen, time of insemination relative to ovulation and embryo transfer on early equine embryonic vesicle growth as determined by ultrasound. *Theriogenology*, 71(8), 1267-1275.

Cuervo-Arango, J., & Clark, A. (2010, Abril). The first ovulation of the breeding season in the mare: the effect of progesterone priming on pregnancy rate and breeding management (hCG response rate and number of services per cycle and mare). *Anim Reprod Sci*, 118(2), 265-269.

Davies Morel, M. C. (2008). *Equine reproductive physiology, breeding and stud management*. (3^a ed.). Oxfordshire, UK: CAB International.

Davies Morel, M. C., & Newcombe, J. R. (2008). The efficacy of different hCG dose rates and the effect of hCG treatment on ovarian activity: ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in the mare. *Anim Reprod Sci*, 109(1), 189-199.

Donadeu, F. X., & Pedersen, H. G. (2008). Follicle development in mares. *Reprod Domest Anim*, 43(s2), 224-231.

Gaivão, M., & Stout, T. (2012). Equine conceptus development – A mini review. *Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária*, 5, 64-72.

Gamboa, S., Machado-Faria, M., & Ramalho-Santos, J. (2009, Julho). Seminal traits, suitability for semen preservation and fertility in the native Portuguese horse breeds Puro Sangue Lusitano and Sorraia: Implications for stallion classification and assisted reproduction. *Anim Reprod Sci*, 113(1), 102-113.

Ginther, O. J. (1998). Equine Pregnancy: Physical Interactions Between the Uterus and Conceptus. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, 44, 73-104. Baltimore, Maryland, USA: American Association of Equine Practicioners.

Ginther, O. J. (2009, 15 de Setembro). A 40-year odyssey into the mysteries of equine luteolysis. *Theriogenology*, 72(5), 591-598.

Ginther, O. J. (2012, 1 de Abril). The end of the tour de force of the corpus luteum in mares. *Theriogenology*, 77(6), 1042-1049.

Ginther, O. J., Gastal, E. L., Gastal, M. O., Siddiqui, M., & Beg, M. (2007, Agosto). Relationships of follicle versus oocyte maturity to ultrasound morphology, blood flow and hormone concentrations of the preovulatory follicle in mares. *Biol Reprod*, 77(2), 202-208.

Ginther, O. J., Gastal, M. O., Gastal, E. L., Jacob, J. C., Siddiqui, M., & Beg, M. (2008a). Effects of age of follicle and hormone dynamics during the oestrous cycle in mares. *Reprod Fertil Dev*, 20(8), 955-963.

Ginther, O. J., Gastal, E. L., Rodrigues, B., Gastal, M. O., & Beg, M. (2008b, Março). Follicle diameters and hormone concentrations in the development of single versus double ovulations in mares. *Theriogenology*, 69(5), 583-590.

Ginther, O. J., Siddiqui, M., & Beg, M. (2009). Progesterone responses to intravenous and intrauterine infusions of prostaglandin F2alpha in mares. *Reprod Fertil Dev*, 21(5), 688-695.

Heise, A., Kähn, W., Volkmann, D. H., Thompson, P. N., & Gerber, D. (2010, Março). Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 118(1), 48-53.

Kareskoski, M., & Katila, T. (2008, Setembro). Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity, *Anim Reprod Sci*, 107(3-4), 249-256.

Katila, T. (1997, Novembro). Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology*, 48(7), 1217-1227.

Katila, T., Reilas, T., Nivola, K., Peltonen, T., & Virtala, A.-M. (2010, 14 de Junho). A 15-year survey of reproductive efficiency of Standardbred and Finnhorse trotters in Finland – descriptive results. *Acta Vet Scand*, 52, 40.

Kuisma, P., Andersson, M., Koskinen, E., & Katila, T. (2006, 17 de Agosto). Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Vet Scand*, 48, 14

LeBlanc, M.M. (2004, Janeiro). Infertility: mares that conceive and lose their pregnancy. *Proceedings of the 10th Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians*, SIVE. Ithaca: International Veterinary Information Service..

LeBlanc, M.M. (2004, Janeiro). Infertilità della gravidanza nella fattrice (Infertility: mares that conceive and lose their pregnancy. *10° Congresso Nazionale Multisala SIVE*. Perugia: SIVE.

LeBlanc, M. M. (2008, Agosto). When to refer an infertile mare to a theriogenologist. *Theriogenology*, 70(3), 421-429.

Leite, T. E., Karam, M. D., Alves, L. P., Pimentel, C. A., & Fiala, S. M. (2011, 9 de Fevereiro). Eficiência Reprodutiva em Equinos de Raça Morgan. *Ciência Animal Brasileira*, 12(2), 274-278.

Ley, W. B. (2004). *Broodmare Reproduction for the Equine Practitioner* (1ª ed.) Salt Lake City: Teton NewMedia.

Loomis, P. R. (2001a). Storage, Handling and Distribution of Frozen. *Proceedings of the Annual Covention of the AAEP*, 47, 296-301. Califórnia, USA: AAEP.

Loomis, P. R. (2001b, Dezembro). The equine frozen semen industry. *Anim Reprod Sci*, 68(3-4), 191-200.

Loomis, P. R. (2012). Semen Processing Techniques for Management of Subfertile Stallions. *Proceedings of the Pre-Congress of the 17th Congresso f the Italien Association of Equine Veterenarians*, 9-13. Montesilvano, USA: IAEV.

Loomis, P. R., & Squires, E. L. (2005, Agosto). Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology*, 64(3), 480-491.

McCue, P. (2009). La Fattrice Problema: I Più Comuni Problemi Riproduttivi in Ambito Clinico (The Problem Mare: Diagnostics and Therapeutics). *15° Congresso Multisal SIVE*, 97-100. Carrara, Itália: SIVE.

McDowell, K. J., Sharp, D. C., Grubaugh, W., Thatcher, W. W., & Wilcox, C. J. (1998, Setembro). Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. *Biol Reprod*, 39(2), 340-348.

Mckinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., & Varner, D. (2011). Equine reproduction (2^a ed.). Indianapolis: Blackwell Publishing.

Meira, C., Ferreira, J. C., Silva, E. S. M., & Ignácio, F. S. (2012, Julho-Setembro). Developmental aspects of early pregnancy in mares. *Anim Reprod Sci*, 9(3), 166-172.

Metcalf, E. S. (2002, 2 de Junho). Maximizing pregnancy rates with shipped semen. *Reproduction: Stallion*.

Morrell, J. M., & Rodriguez-Martinez, H. (2010, 4 de Agosto). Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. *Veterinary Medicine International*, 2011 (article ID 894767), 1-9.

Morris, L. H. A., & Allen, W. R. (2002, Janeiro). Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. *Equine Vet J*, 34(1), 51-60.

Murchie, T. (2005). Stallion infertility. *Proceeding of the North American Veterinary Conference*, Jan. 8-12, 267-269. Orlando, Florida:NAVC.

Nagy, P., Solti, L., Kulcsar, M., Reiczigel, J., Huszenicza, G., Abavary, K. M., et al. (1998). Progesterone determination in equine plasma using different immunoassays. *Acta Vet Hung*, 46(4), 501-513.

Neely, D. P., Stabenfeldt, G. H., & Sauter, C. L. (1979, Março). The effect of exogenous oxytocin on luteal function in mares. *J Reprod Fertil*, 55(2), 303-308.

Noakes, D. E. (2009). *Veterinary reproduction and obstetrics* (9^o ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.

Parkes, A. S. (1962, 14 de Julho). Prospect and Retrospect in the Physiology of Reproduction. *BMJ*, 2(5297), 71-75.

Petrunkina, A. M., Waberski, D., Günzel-Apel A. R., Töpfer-Petersen, E. (2007, Julho). Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction*, 134(1), 3-17.

Pineda, M., & Dooley, M. (2003). *Veterinary endocrinology and reproduction* (5^a ed.). Ames, Iowa: Iowa State Press.

Platt, H. (1978, Setembro). Growth and maturity in the equine fetus. *J R Soc Med*, 71(9), 658-661.

Pycock, J.F. (2008a). Artificial insemination. *Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association*, 224-234. Moscovo, Russia: WEVA.

Pycock J. F. (2008b). Management of the breeding stallion. *Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association*, 216-223. Moscovo, Rússia: WEVA.

Quinn, B. A., Hayes, M. A., Waelchli, R. O., Kennedy, M. W., & Betteridge, K. J. (2007, Julho). Changes in major proteins in the embryonic capsule during immobilization (fixation) of the conceptus in the third week of pregnancy in the mare. *Reproduction*, 134(1), 161-170.

Rambags, B. P. B., van Tol, H. T. A., Van den Eng, M. M., Colenbrander, B., & Stout, T. A. E. (2008, Fevereiro). Expression of progesterone and oestrogen receptors by early intrauterine equine conceptuses. *Theriogenology*, 69(3), 366-375.

Ricketts, S. (2008a). Management of the broodmare. *Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association*, 212-215. Moscovo, Rússia: WEVA.

Ricketts, S. (2008b). Management of the infertile/subfertile mare. *Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association*, 244-256. Moscovo, Rússia: WEVA.

Rizzo, A., Mutinati, M., Spedicato, M., Minoia, G., Trisolini, C., Punzi, S., et al. (2009, Junho). Thyreotropic effect of human Chorionic Gonadotropin (hCG) in mares at estrus. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 31(2), 299-303.

Rose, R. J., & Hodgson, D. R. (1993). *Manual of equine practice* (2ª ed.). Philadelphia: Saunders Elsevier.

Samper, J. C. (2001, 3 de Dezembro). Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Anim Reprod Sci*, 68 (3-4), 219-228.

Samper, J. C. (2009). *Equine breeding management and artificial insemination* (2ª ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.

Samper, J. C., Hellander, J. C., & Crabo, B. G. (1991). Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *J Reprod Fertil. Supplement*, 44, 107-114.

Samper, J. C., Pycock, J. F., & McKinnon, A. O. (2007). *Current therapy in equine reproduction* (1ª ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.

Sellers, R. F. (1983, Setembro). Transmission of viruses by artificial breeding techniques: a review. *J R Soc Med*, 76(9), 772-775

Sieme, H., Bonk, A., Hamann, H., Klug, E., & Katila, T. (2004, 1 de Setembro). Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology*, 62(5), 915-928.

Sieme, H., Schäfer, T., Stout, T. A. E., Klug, E., & Waberski, D. (2003, 1 de Outubro). The effects of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology*, 60(6), 1153-1164.

Singh, J., Adams, G. P., & Pierson, R. A. (2003, 15 de Outubro). Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. *Anim Reprod Sci*, 78(3), 371-399.

Spencer, T. E., & Bazer, F. W. (2004, Julho). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 537-550.

Stevens, R. W. (1969, 8 de Agosto). Developments in veterinary science. Artificial insemination in horses: genetic potential and control. *Can Vet J*, 10(8), 203-207.

Sullivan, J. J., Turner, P. C., Self, L. C., Gutteridge, H. B., & Bartlett, D. E. (1975, 23 de Outubro). Survey of reproductive efficiency in the Quarter-horse and Thoroughbred. *J Reprod Fertil. Supplement*, (23), 315-318.

Taylor-MacAllister C., & Freeman, D. W. (2007, 6 de Julho). *Reproductive management of the mare*. Obtido em 14 de Fevereiro de 2013, de Oklahoma Cooperative Extension Service: <http://pods.dasnr.okstate.edu/docudhare/dsweb/Get/Version-7469/ANSI-3974web.pdf>.

Vanderwall, D. K., Rasmussen, D. M., & Woods, G. L. (2007, 15 de Dezembro). Effect of repeated administration of oxytocin during diestrus on duration of function of corpora lutea in mares. *J Am Vet Med Assoc*, 231(12), 1864-1867.

Varner, D. D., Love, C. C., Blanchard, T. L., Bliss, S. B., Carrol, B. S., Macpherson, M. L. (2010). Breeding-management strategies and semen handling techniques for stallions - case scenarios. Proceedings of the 56th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 215-226. Baltimore, Maryland: AAEP.

Wenkoff, M. S. (1975, 16 de Abril). The use of prostaglandins in reproduction. *Can Vet J*, 16(4), 97-101.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Idade das éguas

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
3	2	4,0	4,0	4,0
4	4	8,0	8,0	12,0
5	7	14,0	14,0	26,0
6	2	4,0	4,0	30,0
7	2	4,0	4,0	34,0
8	3	6,0	6,0	40,0
9	6	12,0	12,0	52,0
Valid 10	2	4,0	4,0	56,0
11	3	6,0	6,0	62,0
12	3	6,0	6,0	68,0
13	4	8,0	8,0	76,0
14	1	2,0	2,0	78,0
15	4	8,0	8,0	86,0
16	3	6,0	6,0	92,0
18	4	8,0	8,0	100,0
Total	50	100,0	100,0	

Apêndice 2 - Estatística descritiva da idade das éguas

	Statistic	Std. Error
Mean	9,92	,644
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 8,63	
	Upper Bound 11,21	
5% Trimmed Mean	9,84	
Median	9,00	
Variance	20,728	
Idade_egua Std. Deviation	4,553	
Minimum	3	
Maximum	18	
Range	15	
Interquartile Range	8	
Skewness	,226	,337
Kurtosis	-1,111	,662

Apêndice 3 - Frequência absoluta e relativa das éguas para IA e para cobrição natural

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
	Cobrição	14	28,0	28,0	28,0
Valid	IA	36	72,0	72,0	100,0
	Total	50	100,0	100,0	

Apêndice 4 - Frequências absoluta e relativa dos diferentes tipos de sémen utilizados

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
	Cobrição	14	28,0	28,0	28,0
	Fresco	16	32,0	32,0	60,0
Valid	Refrigerado	19	38,0	38,0	98,0
	Congelado	1	2,0	2,0	100,0
	Total	50	100,0	100,0	

Apêndice 5 - Éguas gestantes e não gestantes

Case Processing Summary							
	DxGest	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Idade_egua	0	5	100,0%	0	0,0%	5	100,0%
	1	45	100,0%	0	0,0%	45	100,0%

Apêndice 6 - Avaliação da idade das éguas gestantes e não gestantes

Descriptives				
	DxGest		Statistic	Std. Error
Idade_egua	0	Mean	9,00	2,490
		95% Confidence Interval for Lower Bound	2,09	
		Mean Upper Bound	15,91	
		5% Trimmed Mean	8,89	
		Median	6,00	
		Variance	31,000	
		Std. Deviation	5,568	
		Minimum	4	
		Maximum	16	
		Range	12	
		Interquartile Range	11	
		Skewness	,608	,913
		Kurtosis	-2,813	2,000
	1	Mean	10,02	,669
		95% Confidence Interval for Lower Bound	8,67	
		Mean Upper Bound	11,37	
		5% Trimmed Mean	9,96	
		Median	9,00	
		Variance	20,159	
		Std. Deviation	4,490	
		Minimum	3	
		Maximum	18	
		Range	15	
		Interquartile Range	8	
		Skewness	,217	,354
		Kurtosis	-,992	,695

DxGest 0 corresponde a diagnóstico de gestação negativo e DxGest 1 a diagnóstico de gestação positivo.

Apêndice 7 - Avaliação da idade das éguas para cobrição natural e para IA

Descriptives				
	Cob_IA		Statistic	Std. Error
Idade_egua	Cobrição	Mean	7,00	1,022
		95% Confidence Interval for Mean		
		Lower Bound	4,79	
		Upper Bound	9,21	
		5% Trimmed Mean	6,83	
		Median	5,00	
		Variance	14,615	
		Std. Deviation	3,823	
		Minimum	3	
		Maximum	14	
		Range	11	
		Interquartile Range	7	
		Skewness	,694	,597
		Kurtosis	-1,133	1,154
	IA	Mean	11,06	,724
		95% Confidence Interval for Mean		
		Lower Bound	9,59	
		Upper Bound	12,52	
		5% Trimmed Mean	11,04	
		Median	10,50	
		Variance	18,854	
		Std. Deviation	4,342	
		Minimum	4	
		Maximum	18	
		Range	14	
		Interquartile Range	7	
		Skewness	,104	,393
		Kurtosis	-1,185	,768

Apêndice 8 - Quantidade de ciclos por égua

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	1	37	74,0	74,0
	2	9	18,0	92,0
	3	4	8,0	100,0
	Total	50	100,0	100,0

Apêndice 9 - Quantidade de tentativas por égua

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
1	31	62,0	62,0	62,0
2	11	22,0	22,0	84,0
3	6	12,0	12,0	96,0
Valid 4	1	2,0	2,0	98,0
7	1	2,0	2,0	100,0
Total	50	100,0	100,0	

Apêndice 10 - Granhões utilizados

Garanhao				
	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
A	3	6,0	6,0	6,0
B	5	10,0	10,0	16,0
C	1	2,0	2,0	18,0
D	10	20,0	20,0	38,0
E	1	2,0	2,0	40,0
F	6	12,0	12,0	52,0
G	1	2,0	2,0	54,0
H	3	6,0	6,0	60,0
Valid I	4	8,0	8,0	68,0
J	5	10,0	10,0	78,0
L	1	2,0	2,0	80,0
M	6	12,0	12,0	92,0
N	1	2,0	2,0	94,0
O	1	2,0	2,0	96,0
P	1	2,0	2,0	98,0
Q	1	2,0	2,0	100,0
Total	50	100,0	100,0	

Apêndice 11 - Taxas de fertilidade para cobertura natural e para IA

			Cob IA		Total
			Cobrição	IA	
DxGest	Count		3	2	5
	Negativo	% within DxGest	60,0%	40,0%	100,0%
		% within Cob_IA	21,4%	5,6%	10,0%
	Count		11	34	45
	Positivo	% within DxGest	24,4%	75,6%	100,0%
		% within Cob_IA	78,6%	94,4%	90,0%
Total	Count		14	36	50
		% within DxGest	28,0%	72,0%	100,0%
		% within Cob_IA	100,0%	100,0%	100,0%

Apêndice 12 - Teste de Qui-quadrado

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,822 ^a	1	,093	,126	,126
Continuity Correction ^b	1,334	1	,248		
Likelihood Ratio	2,512	1	,113		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	2,765	1	,096		
N of Valid Cases	50				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,40.

b. Computed only for a 2x2 table

Apêndice 13 - Taxas de fertilidade para os diferentes tipos de sémen

			Sémen				Total
			Cobrição	Fresco	Refrigerado	Congelado	
DxGest	Count		3	1	1	0	5
	Negativo	% within DxGest	60,0%	20,0%	20,0%	0,0%	100,0%
		% within Sémen	21,4%	6,2%	5,3%	0,0%	10,0%
	Count		11	15	18	1	45
	Positivo	% within DxGest	24,4%	33,3%	40,0%	2,2%	100,0%
		% within Sémen	78,6%	93,8%	94,7%	100,0%	90,0%
Total	Count		14	16	19	1	50
		% within DxGest	28,0%	32,0%	38,0%	2,0%	100,0%
		% within Sémen	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Apêndice 14 - Testes de normalidade Idade da égua e diagnóstico de gestação

	DxGest	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Idade_égua	0	,305	5	,145	,830	5	,140
	1	,113	45	,188	,948	45	,044

a. Lilliefors Significance Correction

O grupo DxGestação positivo falhou o teste de Shapiro-Wilk para a normalidade ($p=0,0440$). Adicionalmente a amostra do grupo com Dx negativo era apenas de 5 indivíduos. Assim, preconiza-se a utilização de testes não paramétricos.

Apêndice 15 - Testes de normalidade idade da égua e cobrição / IA

	Cob_IA	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Idade_égua	Cobrição	,271	14	,006	,856	14	,027
	IA	,126	36	,156	,940	36	,050

a. Lilliefors Significance Correction

O grupo Cobrição falhou o teste de Shapiro-Wilk para a normalidade ($p=0,027$). Assim, preconiza-se a utilização de testes não paramétricos.

Apêndice 16 - Teste não paramétrico para verificar a influência da idade no diagnóstico de gestação

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Idade_égua is the same across categories of DxGest.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,660 ¹	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

¹Exact significance is displayed for this test.

Apêndice 17 - Avaliação das idades dos animais sujeitos a cobrição natural e a IA

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Idade_égua is the same across categories of Cob_IA.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,003	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Apêndice 18 - Análise descritiva da idade das éguas consoante o número de ciclos

Descriptives				Statistic	Std. Error
	Ciclos				
Idade_egua	Um ciclo	Mean		10,22	,771
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	8,65	
			Upper Bound	11,78	
		5% Trimmed Mean		10,18	
		Median		10,00	
		Variance		22,008	
		Std. Deviation		4,691	
		Minimum		3	
		Maximum		18	
		Range		15	
		Interquartile Range		10	
		Skewness		,073	,388
		Kurtosis		-1,252	,759
		Mean		7,89	,889
	Dois ciclos	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	5,84	
			Upper Bound	9,94	
		5% Trimmed Mean		7,88	
		Median		8,00	
		Variance		7,111	
		Std. Deviation		2,667	
		Minimum		4	
		Maximum		12	
		Range		8	
		Interquartile Range		5	
		Skewness		,101	,717
		Kurtosis		-,895	1,400
		Mean		11,75	3,065
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1,99	
			Upper Bound	21,51	
	Três ciclos	5% Trimmed Mean		11,83	
		Median		12,50	
		Variance		37,583	
		Std. Deviation		6,131	
		Minimum		4	
		Maximum		18	
		Range		14	
		Interquartile Range		12	
		Skewness		-,557	1,014
		Kurtosis		-1,100	2,619

Apêndice 19 – Testes de normalidade entre a idade e o número de ciclos necessários

	Ciclos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Idade_egua	Um ciclo	,137	37	,076	,937	37	,038
	Dois ciclos	,116	9	,200*	,973	9	,919
	Três ciclos	,202	4	.	,969	4	,836

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Apêndice 20 - Verificação de existência de diferenças das idades nos três grupos de ciclos

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Idade_egua is the same across categories of Ciclos.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,329	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Apêndice 21 - Testes de normalidade entre a idade da égua e o número de tentativas

Tests of Normality

	Nº de tentativas	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Idade_egua	1,00	,132	31	,180	,933	31	,053
	2,00	,160	11	,200*	,963	11	,813
	3,00	,168	8	,200*	,919	8	,424

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Apêndice 22 - Teste anova para as médias de idades

ANOVA

Idade_egua

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	72,901	2	36,451	1,817	,174
Within Groups	942,779	47	20,059		
Total	1015,680	49			

Apêndice 23 - Teste POST-Hoc de Tukey para verificar diferenças nos diferentes números de tentativas

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Idade_egua

Tukey HSD

(I) N° de tentativas	(J) N° de tentativas	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,00	2,00	2,628	1,572	,227	-1,18	6,43
	3,00	-,895	1,776	,870	-5,19	3,40
2,00	1,00	-2,628	1,572	,227	-6,43	1,18
	3,00	-3,523	2,081	,219	-8,56	1,51
3,00	1,00	,895	1,776	,870	-3,40	5,19
	2,00	3,523	2,081	,219	-1,51	8,56